

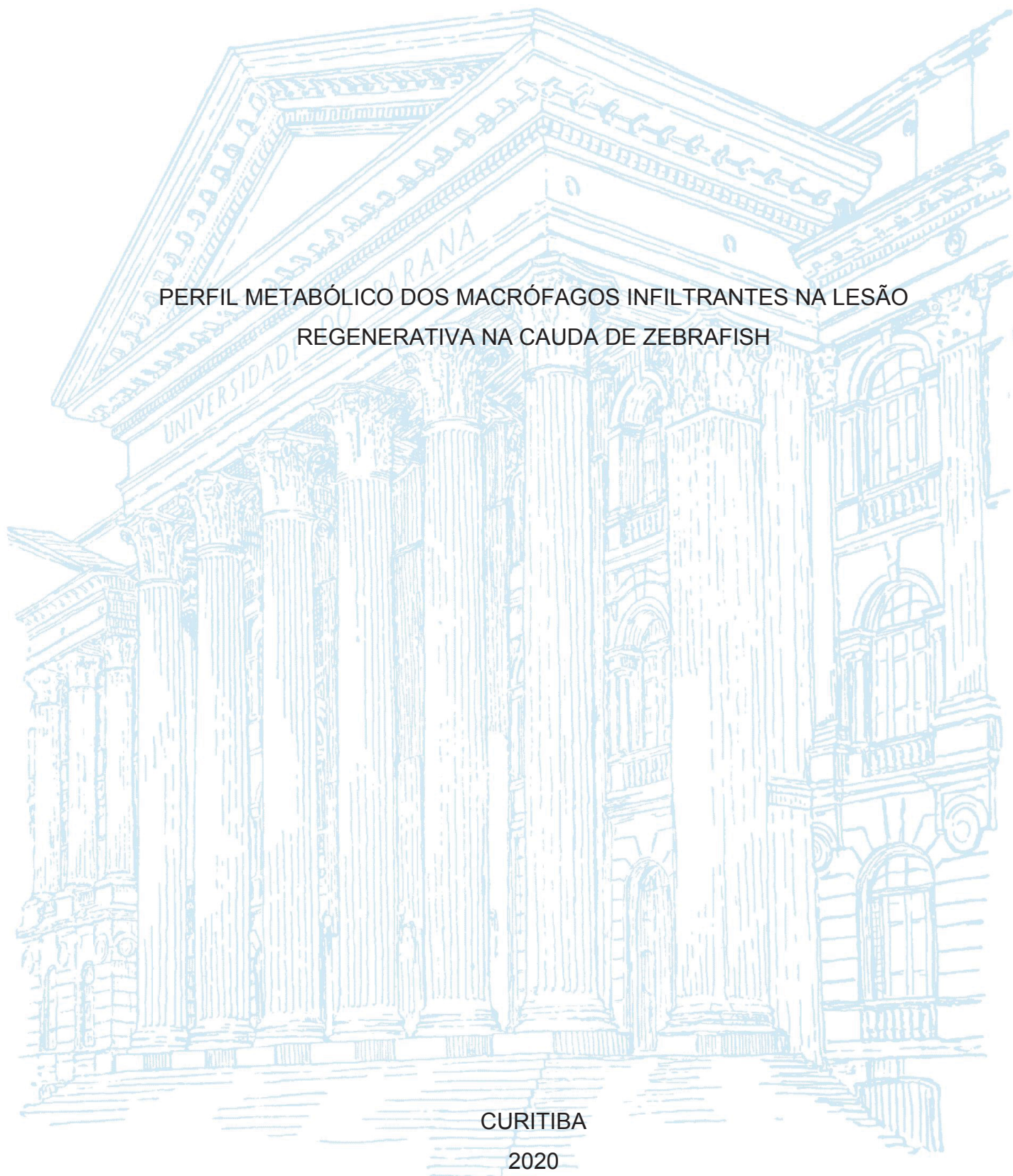
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAIS CAVALIERI PAREDES

PERFIL METABÓLICO DOS MACRÓFAGOS INFILTRANTES NA LESÃO
REGENERATIVA NA CAUDA DE ZEBRAFISH

CURITIBA

2020



LAIS CAVALIERI PAREDES

PERFIL METABÓLICO DOS MACRÓFAGOS INFILTRANTES NA LESÃO
REGENERATIVA NA CAUDA DE ZEBRAFISH

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Tércio Teodoro Braga

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Paredes, Lais Cavalieri

Perfil metabólico dos macrófagos infiltrantes na lesão regenerativa na cauda de Zebrafish. / Lais Cavalieri Paredes. – Curitiba, 2020.
77 p.: il.

Orientador: Tércio Teodoro Braga

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia..

1. Peixe. 2. Regeneração (Biologia). 3. Macrófagos. 4. Metabolismo. I. Título. II. Braga, Tércio Teodoro, 1985-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 597.482



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044PQ

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de LAIS CAVALIERI PAREDES intitulada: **PERFIL METABÓLICO DOS MACRÓFAGOS INFILTRANTES NA LESÃO REGENERATIVA NA CAUDA DE ZEBRAFISH**, sob orientação do Prof. Dr. TÁRCIO TEODORO BRAGA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Março de 2020.

TÁRCIO TEODORO BRAGA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

NIELS OLSEN SARAIVA CAMARA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre me deu forças para continuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lucimar e Amarildo, e aos meus irmãos Vinícius e Mateus, por todo suporte, carinho e, principalmente, muito incentivo, nos momentos que mais precisei.

Agradeço também, aos meus avós, Ida e Clemente, por sempre me receberem de braços abertos com muito amor e muitos cafés.

Agradeço à minha avó Yara e ao meu tio Aramis, pelo incentivo à ciência e pelas conversas interessantes sobre o tema.

Agradeço à toda minha família, em especial, as minhas primas, pelos ótimos momentos que temos passado juntas.

Agradeço ao Prof. Tércio, por acreditar no meu potencial, por me orientar tão bem, por aceitar minhas ideias e por mergulhar nesse projeto tanto quanto eu. Agradeço por ter conhecido e tido o prazer de ter como orientador essa pessoa tão inspiradora.

Agradeço ao pessoal do CTAF, à Alessandra e ao Israel, por me auxiliarem na obtenção de imagens muito belas e pelos ensinamentos em relação ao microscópio.

Agradeço ao pessoal do laboratório de imunologia da fibrose experimental (LIFE), pelos ótimos momentos e pelos aprendizados que tive com vocês, quero agradecer ao Guilherme, Mariana, Murilo, Amani, Rebeca, Ollavo e aos recém-chegados ao Laboratório, espero que aproveitem tanto, se não mais, que eu.

Agradeço, em especial, a Amani, por todo apoio que tem me dado durante esses dois anos, se tornou uma ótima amiga. Quero agradecer também ao Lucas e a Claudinha, pelos almoços e conversas descontraídas, tão necessárias às vezes.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Imunologia de Transplantes (LIT), à Bárbara, à Camila, ao Bruno, à Mariana, à Tati, e aos demais alunos, por toda a ajuda e pela recepção que foi me dada, para execução de alguns experimentos, vocês fizeram com que eu me sentisse em casa. Agradeço também ao Prof. Niels, quem me recebeu de portas abertas.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Toxicologia Ambiental, à Prof. Helena, por nos receberem tão bem e pela colaboração que conseguimos iniciar.

Agradeço à Prof. Claudia Feijó, à Melissa e à Mariliza, pelo auxílio material e pela troca de conhecimento técnico.

Agradeço as instituições, UFPR, CAPES e CNPq pela oportunidade de aprendizado e pelo fomento à pesquisa. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, e aos professores do programa pelos ensinamentos e oportunidades de desenvolvimento.

Agradeço à Cassiana, Bianca, Ana, Fernanda, Thais e Pedro, pelas amizades de longa data que temos cultivado.

Agradeço à minha melhor amiga: Katyri. Agradeço pelas risadas, lágrimas e conversas compartilhadas, por todo apoio que tem me dado para enfrentar as dificuldades, e pelo incentivo para seguir meus sonhos, agora junto aos seus.

Agradeço a todas as pessoas aqui não citadas, mas não menos importantes.
Por fim, agradeço a vida!

"Se você ultrapassar aquela sensação de medo, aquele sentimento de estar correndo um risco, coisas verdadeiramente maravilhosas podem acontecer."

Marissa Mayer

RESUMO

Em contraste com os mamíferos, o zebrafish (*Danio rerio*) tem a habilidade de regenerar tecidos lesionados como o tecido cardíaco, a retina ou diferentes tecidos presentes na cauda, o que o torna um modelo ideal para estudos de regeneração. Sabe-se que as células do sistema imune inato desempenham papéis essenciais na regeneração ao serem submetidas a modificações fenotípicas e funcionais ao longo de todo o processo. Apesar disso, alguns aspectos dos mecanismos moleculares através dos quais essas células orquestram a regeneração continuam desconhecidos. Portanto, este estudo visou avaliar a dinâmica de infiltração de macrófagos e neutrófilos na lesão durante o processo regenerativo da cauda em larvas de zebrafish. Além disso, buscou-se compreender a relação entre o sistema redox e o metabolismo das células do sistema imune durante o processo regenerativo, ao se correlacionarem os fenótipos e perfis infiltrantes dos fagócitos com a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase. A amputação da cauda foi realizada em larvas transgênicas para as moléculas *macrophage-expressed gene 1* (mpeg1) e *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) 72 horas pós-fertilização (hpf), seguido de imageamento por microscopia confocal. Paralelamente, foram analisadas as atividades das enzimas envolvidas no sistema antioxidante (superóxido dismutase, catalase e glutathione-S-transferase). Demonstrou-se a transição de fenótipo dos macrófagos de um perfil pró-inflamatório para anti-inflamatório. Além disso, um aumento no número de neutrófilos (células lyz:dsRed/mpx:GFP+) e macrófagos (células mpeg1+) presentes na lesão foram observados, seguido de uma diminuição nos neutrófilos 168 horas pós-amputação (hpa). Em comparação aos grupos controle, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são mais elevadas em 24 e 120 hpa, respectivamente. Maiores níveis de peroxidação lipídica foram detectados durante a regeneração. Há, portanto, uma dinâmica de infiltração caracterizada inicialmente pela chegada de neutrófilos no local da lesão, seguida de macrófagos inflamatórios e anti-inflamatórios, com resolução da infiltração de neutrófilos em 168 hpa. Apesar do estresse oxidativo, observou-se uma resposta antioxidante ao longo da regeneração da nadadeira caudal, caracterizada pelo aumento da atividade da SOD e CAT em 1 e 5 dpa, respectivamente. O presente trabalho irá contribuir com estudos futuros acerca do desenvolvimento de terapias celulares objetivando maior efetividade no tratamento de doenças relacionadas com a formação de tecido fibrótico.

Palavras-chave: Zebrafish. Regeneração. Macrófagos. Metabolismo. Redox.

ABSTRACT

In contrast to mammals, zebrafish (*Danio rerio*) has the ability to regenerate injured tissues such as heart tissue, the retina or different tissues present in the tail, making it an ideal model for regeneration studies. It is known that cells of the innate immune system play essential roles in regeneration due to the fact that they are subjected to phenotypic and functional changes throughout the process. Despite this, some aspects of the molecular mechanisms by which these cells orchestrate regeneration remain unknown. Therefore, this study aimed to evaluate the dynamics of infiltration of macrophages and neutrophils in the lesion during the regenerative process of the fin fold in zebrafish larvae. In addition, we sought to understand the relationship between the redox system and the metabolism of immune system cells during the regenerative process, by correlating phagocyte phenotypes and infiltrating profiles with the activity of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase. Fin fold amputation was performed on transgenic larvae for the macrophage-expressed gene 1 (mpeg1) molecules and tumor necrosis factor alpha (TNF α) 72 hours post-fertilization (hpf), followed by confocal microscopy imaging. In parallel, the activities of enzymes related to the antioxidant system (superoxide dismutase, catalase and glutathione-S-transferase) were analyzed. The macrophage phenotype transition from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory profile was demonstrated. In addition, an increase in the number of neutrophils (lyz:dsRed/mpx:GFP+ cells) and macrophages (mpeg1+ cells) present in the injury site were observed, followed by a decrease in neutrophils 168 hours post-amputation (hpa). The enzymatic activity of antioxidant molecules was determined at 24 and 120 hpa. In comparison to the control groups, the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) are higher at 24 and 120 hpa, respectively. Higher levels of lipid peroxidation were detected during regeneration. There is, therefore, an infiltration dynamic characterized initially by the arrival of neutrophils at the lesion site, followed by inflammatory and anti-inflammatory macrophages, with resolution of neutrophil infiltration at 168 hpa. Despite oxidative stress, an antioxidant response was observed throughout the regeneration of the caudal fin, characterized by an increase in the activity of SOD and CAT by 1 and 5 dpa, respectively. The present work can contribute to future studies on the development of cell therapies, achieving greater effectiveness in the treatment of diseases related to the formation of fibrotic tissue.

Keywords: Zebrafish. Regeneration. Macrophages. Metabolism. Redox.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTÍMULOS, MARCADORES DE SUPERFÍCIE E CITOCINAS SECRETADAS POR MACRÓFAGOS M1 e M2	24
FIGURA 2 – PROTOCOLO DE ALIMENTAÇÃO DO ZEBRAFISH	34
FIGURA 3 – METODOLOGIA EMPREGADA NO ESTUDO DE REGENERAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL EM LARVAS DE ZEBRAFISH	34
FIGURA 4 – ILUSTRAÇÃO DA AMPUTAÇÃO DA DOBRA DA NADADEIRA CAUDAL EM LARVA DE ZEBRAFISH	35
FIGURA 5 – NADADEIRAS CAUDAIS DE LARVAS DE ZEBRAFISH EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-FERTILIZAÇÃO E PÓS-AMPUTAÇÃO	40
FIGURA 6 – NEUTRÓFILOS INFILTRANTES NA LESÃO REGENERATIVA DA NADADEIRA CAUDAL DO ZEBRAFISH (CÉLULAS Iyz+/mpx+)	43
FIGURA 7 – MACRÓFAGOS INFILTRANTES NO LOCAL DA LESÃO REGENERATIVA	46
FIGURA 8 – NÚMERO DE MACRÓFAGOS NA LESÃO REGENERATIVA NA NADADEIRA CAUDAL DO ZEBRAFISH	47
FIGURA 9 – EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO E METABOLISMO DE MACRÓFAGOS	49
FIGURA 10 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SUPERÓXIDO DISMUTASE, CATALASE E GLUTATIONA-S-TRANSFERASE NOS DIAS 1 E 5 PÓS-AMPUTAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL	51
FIGURA 11 – GRÁFICOS DE TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OCR) E TAXA DE ACIDIFICAÇÃO EXTRACELULAR (ECAR) EM LARVAS DE ZEBRAFISH COM 8 DPF	55
FIGURA 12 – GRÁFICOS DE TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OCR) E TAXA DE ACIDIFICAÇÃO EXTRACELULAR (ECAR) EM LARVAS DE ZEBRAFISH COM 8 DPF	56

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ÁREA DA NADADEIRA CAUDAL EM REGENERAÇÃO NORMALIZADA PARA PORCENTAGEM (%).....	41
GRÁFICO 2 – ÁREA DA NADADEIRA CAUDAL EM REGENERAÇÃO EXIBIDA EM MICRÔMETROS QUADRADOS (μm^2)	42
GRÁFICO 3 – NEUTRÓFILOS INFILTRANTES NA LESÃO REGENERATIVA (300 μm) DA CAUDA DE ZEBRAFISH	44
GRÁFICO 4 – INFILTRAÇÃO DE MACRÓFAGOS TOTAIS DURANTE O PROCESSO REGENERATIVO DA NADADEIRA CAUDAL	47
GRÁFICO 5 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LARVAS DE ZEBRAFISH DURANTE O PROCESSO REGENERATIVO.....	52
GRÁFICO 6 – REPRESENTAÇÃO DA RESPIRAÇÃO BASAL DE LARVAS CONTROLE FRENTE À LARVAS EM REGENERAÇÃO	53
GRÁFICO 7 – CORRELAÇÃO ENTRE A DINÂMICA DE INFILTRAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INATO E AS ENZIMAS CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE DURANTE A REGENERAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL DO ZEBRAFISH	58

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

EROs	- Espécies reativas de oxigênio
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
WE	- <i>wound epidermis</i> (camada epidérmica)
VEGF	- Fator de crescimento vascular endotelial
DAMPs	- Padrões moleculares associados à dano
SFK	- Família SRC de proteínas-quinase
Wnt	- Via de sinalização Wnt
IGF1	- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
mTORC1	- Alvo mecanístico do complexo 1 da rapamicina
fgfr	- receptor do fator de crescimento de fibroblastos
msx	- proteína <i>homeobox msx</i>
hox	- genes <i>homeobox</i>
IL-1	- Interleucina 1
IFN- γ	- Interferon-gama
IL-12	- Interleucina 12
IL-4	- Interleucina 4
IL-13	- Interleucina 13
LPS	- Lipopolissacarídeo
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
IL-1 β	- Interleucina 1 beta
IL-10	- Interleucina 10
TGF- β	- Fator de crescimento transformante beta
PAMPs	- Padrões moleculares associados à patógenos
TLR	- Receptores do tipo Toll
Fc γ	- Receptor Fc gama
MMP13	- Gene codificante da enzima collagenase 3
CD200	- Glicoproteína de membrana OX-2
RELM α	- Resistina alfa
IKK α	- Quinase IKK alfa
PD-L2	- Ligante de morte programada 2
CSF1	- Fator estimulante de colônias de macrófagos
MMPs	- Família das metaloproteinases

NOS2	- Óxido nítrico sintase 2
ARG1	- Arginase 1
IL-6	- Interleucina 6
ATP	- Adenosina trifosfato
Irf8	- Fator regulatório interferon 8
NO	- Óxido nítrico
iNOS	- Óxido nítrico sintase
HIF1 α	- Fator 1-alfa induzível por hipóxia
GAPDH	- Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
G6PD	- Glicose-6-fosfato desidrogenase
G6P	- Glicose-6-fosfato
NADPH	- Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
Fgf20	- Fator de crescimento 20 de fibroblastos
JNK	- quinase c-Jun n-terminal
SDF1	- Fator 1 derivado de células estromais (CXCL12)
dpf	- Dias pós-fertilização
dpa	- Dias pós-amputação
hpa	- Horas pós-amputação
mpeg1	- <i>Macrophage-expressed gene 1</i>
lys	- Lisozima
mpx	- Mieloperoxidase
WT	- <i>wild-type</i>
NOX2	- NADPH oxidase 2 ou subunidade beta do citocromo b
AKT	- Proteína quinase B
AMPK	- Proteína quinase ativada por AMP
CD36	- Glicoproteína de plaquetas 4 (<i>cluster of differentiation 36</i>)
PPAR γ	- Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL	20
2.1.1 Regeneração da cauda	21
2.2 MACRÓFAGOS	23
2.2.1 Macrófagos no contexto regenerativo	25
2.2.2 Imunometabolismo de macrófagos	29
2.3 SINALIZAÇÃO REDOX NA REGENERAÇÃO	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA	33
3.2 LINHAGENS E MANUTENÇÃO DOS PEIXES	33
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	34
3.4 ENSAIOS DE REGENERAÇÃO E IMAGEAMENTO	34
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E RT-PCR.....	35
3.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	36
3.7 RESPIROMETRIA.....	37
3.8 RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO	37
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	39
4.1 O PROCESSO REGENERATIVO ESTÁ COMPLETO 7 DIAS PÓS- AMPUTAÇÃO E OS NEUTRÓFILOS SÃO RAPIDAMENTE RECRUTADOS PARA O LOCAL DA LESÃO.....	39
4.2 EM 5 DIAS PÓS-AMPUTAÇÃO HÁ UM PICO DE MACRÓFAGOS PRÓ- RESOLUTIVOS.....	44
4.3 A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO NÃO É ALTERADA AO LONGO DA REGENERAÇÃO.....	48
4.4 BALANÇO OXIDATIVO DIFERENCIAL EM DIFERENTES TEMPOS DURANTE A REGENERAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL EM ZEBRAFISH	49

4.5 TAXAS DE RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM DOIS TEMPOS DO PROCESSO REGENERATIVO DA NADADEIRA CAUDAL DO ZEBRAFISH	52
5 DISCUSSÃO	59
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO I.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os animais desenvolveram estratégias para responder à patógenos e lesões teciduais e essas estratégias diferem bastante entre as espécies das classes de mamíferos, anfíbios e peixes (FUMAGALLI; ZAPPERI; LA PORTA, 2018). O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo que, em contraste com os mamíferos, apresenta uma alta capacidade regenerativa de órgãos e tecidos (ITOU; KAWAKAMI; BURGOYNE; KAWAKAMI, 2012). O zebrafish representa um modelo animal relativamente novo que tem sido empregado em estudos de diferentes aspectos biológicos, e em especial a regeneração de órgãos devido à sua habilidade em regenerar completamente retina, cérebro, rins, medula espinhal e nadadeiras após lesões, de forma a restaurar completamente suas funções (BEFFAGNA, 2019). Ao levar em consideração a regeneração da nadadeira caudal, o zebrafish é um excelente organismo para estudar o processo regenerativo epimórfico, caracterizado pelo crescimento de uma nadadeira totalmente funcional através da formação de uma camada epidérmica e blastema, uma massa de células altamente proliferativas e indiferenciadas (PFEFFERLI; JAŻWIŃSKA, 2015).

O sistema imune apresenta funções relevantes durante a homeostasia tecidual, e tem-se demonstrado importante na modulação da regeneração e de processos de reparo teciduais após a formação de lesões. Células imunes estão envolvidas em uma ampla gama de processos, incluindo inflamação, sinalização associada à dano, desdiferenciação e reposição celulares, além da formação de cicatrizes fibróticas e de suas resoluções (OISHI; MANABE, 2018). Além disso, células do sistema imune inato, como os macrófagos e neutrófilos, são recrutadas precocemente para o local da lesão e auxiliam eliminando debris celulares e secretando moléculas sinalizadoras que induzem proliferação celular e programas de diferenciação que são importantes para uma regeneração bem-sucedida (LAI; MARÍN-JUEZ; STAINIER, 2019). Adicionalmente, uma regeneração bem-sucedida precisa de uma resposta celular imune equilibrada e o recrutamento de células imunes polarizadas que facilitam o processo regenerativo (ABNAVE; GHIGO, 2019; LAI; MARÍN-JUEZ; STAINIER, 2019). Os macrófagos, por exemplo, exibem fenótipos e padrões de expressão gênica distintos dependendo da localização em que se encontram, microambiente, entre outros fatores. Uma nomenclatura comum para essas células foi necessária e então proposta, e que depende da fonte dessas células

e é baseada em uma coleção de marcadores ou de estímulos diferenciais (MURRAY; ALLEN; BISWAS; FISHER *et al.*, 2014). Em suma, células pró-inflamatórias ou macrófagos M1 são células intimamente relacionadas a células T CD4+ com resposta Th1 e tem como funções principais a eliminação de agentes bacterianos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, enquanto células anti-inflamatórias ou pró-resolutivas (M2) são relacionadas a células T CD4+ com resposta do tipo Th2 e são responsáveis pela defesa contra parasitos, remodelamento tecidual e pela secreção de mediadores imunomodulatórios (TACKE; ZIMMERMANN, 2014). Dependendo do contexto biológico, os macrófagos podem expressar marcadores que correspondem a ambos fenótipos, e diversos estudos tem sugerido que macrófagos de lesão exibem estados de polarização dinâmicos e dependentes do ambiente da região injuriada (BRANCATO; ALBINA, 2011; CAO; HARRIS; WANG, 2015; CHAZAUD, 2014; DALEY; BRANCATO; THOMAY; REICHNER *et al.*, 2010).

Os neutrófilos são células que também participam no desenvolvimento e resolução da inflamação resultante de uma lesão (KEIGHTLEY; WANG; PAZHAKH; LIESCHKE, 2014). Essas células tem destaque em sua função antimicrobiana devido à síntese de enzimas com alto potencial microbicida. É importante ressaltar que além dessa função, o recrutamento de neutrófilos para o local injuriado demonstra os passos iniciais da resposta anti-inflamatória, uma vez que a mieloperoxidase, majoritariamente produzida pelos neutrófilos, é liberada no local e consome o peróxido de hidrogênio, levando à diminuição da sinalização inflamatória, como sugere-se em estudos utilizando zebrafish mutante deficiente para a mieloperoxidase (BUCHAN; PRAJSNAR; OGRYZKO; DE JONG *et al.*, 2019; PASE; NOWELL; LIESCHKE, 2012; SCHÜRMANN; FORRER; CASSE; LI *et al.*, 2017). Além disso, os neutrófilos tem a função de promover a conversão fenotípica de macrófagos M1 à macrófagos M2 através da produção de mediadores que estimulam essa conversão, que pode resultar, consequentemente, em reparo e regeneração tecidual (YANG; TAO; WU; ZHAO *et al.*, 2019).

Células do sistema imune e outros tipos celulares como epiteliais e endoteliais podem produzir EROs (BAE; OH; RHEE; YOO, 2011), que, por fim, participam em uma variedade de vias de sinalização que são necessárias para uma regeneração adequada (ROMERO; MCCATHIE; JANKUN; ROEHL, 2018). Vale ressaltar que o excesso de EROs pode resultar em dano tecidual e pode levar à um microambiente disfuncional, porém esse não é o caso em alguns cenários, já que células possuem

sistemas antioxidantes endógenos, a exemplo das enzimas catalase e superóxido dismutase, garantindo um equilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (STHIJNS; VAN BLITTERSWIJK; LAPOINTE, 2018). Neste estudo, realizaram-se análises por microscopia confocal, PCR quantitativa em tempo real e ensaios bioquímicos com a finalidade de investigar os perfis metabólicos dos macrófagos em um contexto de regeneração da nadadeira caudal do zebrafish em fase larval. Demonstrou-se que essas células imunes, com um fenótipo majoritariamente pró-inflamatório, são recrutadas para o local da lesão e que, mais tarde, em 5 dias pós-amputação da nadadeira são encontradas com fenótipo anti-inflamatório. Além disso, detectou-se maior atividade da enzima catalase ao final da fase de recrescimento. Esses achados permitiram-nos levantar a hipótese de que os macrófagos polarizam de um estado pró-inflamatório para um estado pró-resolutivo devido à um microambiente mais favorável, que é determinado pelo sistema redox regulado durante o processo regenerativo.

1.1 JUSTIFICATIVA

A fisiopatologia de diversas doenças se baseia no processo de transição entre a fibrose e a regeneração tecidual. Após uma lesão tecidual, inicialmente, uma grande quantidade de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, são recrutadas. Essas células passam por alterações fenotípicas e funcionais ao longo do processo de cicatrização devido principalmente a respostas a fatores de crescimento e citocinas produzidas no microambiente tecidual (WYNN; VANNELLA, 2016). O uso do zebrafish como modelo de pesquisa, por ter uma regeneração tecidual bastante efetiva, com pouca ou nenhuma formação de tecido fibrótico, possibilita o entendimento da função de diversos tipos celulares e diversas vias metabólicas durante o processo de regeneração tecidual.

Os macrófagos e suas subpopulações fenotípicas pró- e anti-inflamatórias, têm um papel fundamental no processo de regeneração tecidual (WYNN; VANNELLA, 2016). Através de técnicas de microscopia confocal, respirometria, avaliação de genes e proteínas envolvidas nos processos inflamatórios, oxidativos e fibróticos, este estudo visa analisar e elucidar possíveis papéis e as funções destes tipos celulares na regeneração tecidual após a ressecção da porção final da cauda de zebrafish.

Identificar as funções e avaliar a dinâmica de aparecimento de neutrófilos e diferentes subtipos de macrófagos em lesões da cauda de zebrafish permitirá compreender melhor a regeneração no modelo animal. Em estudos futuros, os dados poderão ser utilizados para o desenvolvimento de terapias utilizando diferentes fenótipos de macrófagos para uma maior efetividade no tratamento de doenças que envolvem uma regeneração tecidual prejudicada, nos quais há formação de tecido fibrótico após lesões teciduais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a dinâmica de infiltração de células do sistema imune na borda da lesão na cauda do zebrafish e identificar as vias metabólicas dos neutrófilos e macrófagos infiltrantes em diferentes tempos do processo regenerativo.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a regeneração da porção final da cauda das larvas de zebrafish em diferentes tempos após a transecção cirúrgica;
- Identificar os tipos celulares presentes em diferentes tempos do processo de regeneração em larvas de zebrafish;
- Definir a dinâmica de infiltração dos neutrófilos e macrófagos *in vivo*;
- Avaliar o perfil metabólico presente nos animais durante a regeneração em larvas de zebrafish;
- Examinar a expressão de genes relacionados com os perfis antioxidantes, fibróticos e inflamatórios presentes em zebrafish em diferentes tempos da regeneração;
- Analisar o perfil redox tecidual durante a regeneração caudal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL

Ao longo das últimas três décadas o zebrafish, um peixe teleósteo de água doce, tem sido cada vez mais estudado e empregado como modelo animal de experimentação em diversas áreas da ciência. Em sua taxonomia, a espécie, *Danio rerio*, faz parte do reino Animalia, filo Chordata, classe Actinopterygii (infraclasse Teleostei), ordem Cypriniformes e família Cyprinidae. É uma espécie com um tamanho pequeno, que varia entre 4 e 5 cm de comprimento quando adulta, encontrada em rios e lagos, e nativa do Paquistão e Índia (LESSMAN, 2011). Machos e fêmeas podem ser diferenciados anatomicamente de forma relativamente simples, onde os machos possuem um corpo mais alongado, faixas pretas mais destacadas por todo o corpo (origem do nome, peixe-zebra), além de uma coloração marcadamente dourada nas regiões da barriga e nadadeiras. As fêmeas, por sua vez, costumam ter a região abdominal mais saliente, principalmente quando estão em período de oviposição, e possuem menos coloração dourada espelhada pelo corpo (WIXON, 2000).

Diversos fatores contribuem para que o zebrafish seja um modelo adequado para fins de estudo. Inicialmente, sua disponibilidade é bem vasta, ele requer baixos custos de manutenção, um cuidado muito simples quando comparado a outros modelos animais, e um armazenamento muito fácil, por seu tamanho diminuto, em ambiente de laboratório. É um peixe ovíparo de fertilização externa, com o desenvolvimento embrionário muito rápido, durando de 2 a 4 dias (D'COSTA; SHEPHERD, 2009). Além disso, possuem a habilidade de reprodução semanal que resulta em um grande número de embriões que se desenvolve ex utero, permitindo estudos de desenvolvimento embrionário, etc. (POUREETEZADI; WINGERT, 2016). Os embriões da espécie são translúcidos, o que facilita a visualização de estruturas em microscópio óptico simples e os torna ideais para imageamento *in vivo* a fim de investigar fenômenos biológicos em níveis subcelulares, celulares e de sistemas (ANTINUCCI; HINDGES, 2016). Suas nadadeiras caudais, em adultos, compreendem de 16 a 18 raios ósseos, que se estendem ao longo da cauda, sendo separados por um tecido inter-raios. Esses ossos são segmentados e cobertos por uma epiderme, onde também se observam vasos sanguíneos, nervos, células pigmentadas e células

fibroblásticas. Essas nadadeiras são facilmente removidas cirurgicamente e possuem uma regeneração rápida e saudável (WEHNER; WEIDINGER, 2015; WIXON, 2000).

2.1.1 Regeneração da cauda

O entendimento dos processos de fibrose e regeneração tecidual é de extrema relevância para a elucidação de diversas doenças e traumas que têm como origem uma regeneração prejudicada. Geralmente, quando ocorre uma lesão, há o intercâmbio dos estados regenerativo e fibrótico nos tecidos, que depende das características do tecido lesionado e da capacidade regenerativa da espécie em questão (JULIER; PARK; BRIQUEZ; MARTINO, 2017). De certa forma, todos os animais desenvolveram estratégias frente as doenças e as lesões, porém essas estratégias diferem bastante quando se comparam alguns mamíferos com anfíbios e peixes, por exemplo (TANAKA; REDDIEN, 2011). Esses, são capazes de regenerar coração, retina, membros, entre outros, como é o caso do zebrafish (BEFFAGNA, 2019; GEMBERLING; BAILEY; HYDE; POSS, 2013).

Existem três processos de regeneração distintos nos vertebrados, sendo a regeneração epimórfica a forma ocorrente em zebrafish. Os outros processos existentes são o crescimento compensatório (KAN; JUNGHANS; IZPISUA BELMONTE, 2009), que tem como exemplo principal a regeneração do fígado após uma hepatectomia parcial em humanos e a regeneração tecidual, caracterizada pelo reparo predominante de um único tipo celular. A regeneração no zebrafish acontece pela formação de um blastema, caracterizado por uma população de células progenitoras capazes de interagir com células epiteliais, interação esta, necessária para a reconstrução da área injuriada (BLUM; BEGEMANN, 2012).

Em adultos, a primeira etapa no processo é a rápida formação, proveniente de migração, de uma camada contendo células da epiderme na região da lesão – *wound epidermis* (WE) – que posteriormente se especializa e desenvolve uma expressão gênica diferente do tecido epidérmico normal. Concomitantemente, ocorre o processo de angiogênese, que requer a sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A segunda etapa é a formação do blastema propriamente dito, que parece ser induzida por sinais produzidos na WE. Entre 2 e 4 dias pós-lesão, a cauda inicia a recuperação do seu crescimento, com aumento na velocidade do ciclo celular, tendo o ciclo encurtado de 6 para 1 hora. Finalmente, as células do blastema

começam a se diferenciar em outros tipos celulares, como os escleroblastos, que secretam matriz para formação de novos ossos (STOICK-COOPER; MOON; WEIDINGER, 2007).

Da mesma maneira, em larvas com 72 horas pós-fertilização, quando a nadadeira caudal é lesionada, sinais são liberados nos primeiros instantes para que a lesão se feche, evitando ou mitigando a entrada de patógenos (CHABLAIS; JAZWINSKA, 2010). Devido ao choque mecânico e osmótico ao redor da lesão, são liberados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), a exemplo do ATP. Isso causa a elevação nos níveis de cálcio intracelulares, levando à liberação de eicosanoides, responsáveis por atrair leucócitos. Dentro de minutos, espécies reativas de oxigênio são produzidas pela enzima *Dual oxidase* (Duox) e difundidas ao longo da cauda. Essas espécies, por sua vez, atuam no sistema imune através da ativação de Lyn - uma proteína da SFK, também promovendo a infiltração de células do sistema imune (ROEHL, 2018).

Estudos demonstram a participação de diversas vias de sinalização na regeneração da nadadeira caudal. Entre essas vias, tem-se a via Wnt/ β -catenina, conhecida por seu papel na regulação direta da proliferação e manutenção de diversas células-tronco e outras células progenitoras durante o desenvolvimento e homeostasia tecidual, com estudos mais recentes demonstrando que a via é essencial para a proliferação do blastema, remodelamento da WE e maturação dos osteoblastos (WEHNER; CIZELSKY; VASUDEVARO; OZHAN *et al.*, 2014). Além dessas vias, existem muitas outras descritas na literatura como necessárias para a regeneração da nadadeira caudal do zebrafish (BLUM; BEGEMANN, 2012; POSS; SHEN; NECHIPORUK; MCMAHON *et al.*, 2000; WEHNER; WEIDINGER, 2015). São vias importantes para o desenvolvimento embrionário, mas que também estão presentes no processo regenerativo, sendo elas as vias de sinalização Notch, IGF (CHABLAIS; JAZWINSKA, 2010), activina (JAŻWIŃSKA; BADA KOV; KEATING, 2007), mTORC1 (HIROSE; SHIOMI; HOZUMI; KIKUCHI, 2014), calcineurina (WEHNER; WEIDINGER, 2015), receptor do fator de crescimento de fibroblastos (POSS; SHEN; NECHIPORUK; MCMAHON *et al.*, 2000) e de genes da classe dos *homeobox*, *homeobox msx coding protein* e *homeobox hox coding protein* (AKIMENKO; JOHNSON; WESTERFIELD; EKKER, 1995; THUMMEL; JU; SARRAS; GODWIN, 2007). Além disso, uma análise proteômica quantitativa feita durante a regeneração epimórfica da cauda demonstrou regulação diferencial de diversas proteínas entre o

grupo com lesão e animais controle. A maior parte dessas proteínas foram relacionadas com a manutenção da estrutura e arquitetura celular, sendo algumas associadas com a via de remodelamento do citoesqueleto e outras com o sistema imune. Os achados mais significativos em termos de regulação distinta incluíram a queratina e suas dez isoformas, a cofilina-2, a anexina a1, dentre outras (SAXENA; SINGH; LAKSHMI; MEGHAH *et al.*, 2012).

Além dessas vias, alguns estudos tem apontado a participação de macrófagos na regeneração através de síntese proteica, da angiogênese, da produção e liberação de citocinas a exemplo do VEGF e da IL-1, e através da promoção da proliferação celular (KOH; DIPIETRO, 2011). Com o avanço da tecnologia em ferramentas genéticas, cada vez mais é possível se entender os papéis específicos dos macrófagos em cada uma dessas funções.

2.2 MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células do sistema imune inato de origem mielóide posicionadas de forma estratégica em tecidos e desempenhando papéis na defesa do corpo e em processos inflamatórios, também sendo importantes para o desenvolvimento tecidual e homeostasia (GORDON; MARTINEZ-POMARES, 2017). Essas células podem se derivar do saco vitelino ou dos monócitos circulantes. Estão presentes em quase todos os tecidos e, dependendo da sua localização, apresentam fenótipos distintos, além de padrões de expressão gênica diferentes (HALDAR; MURPHY, 2014).

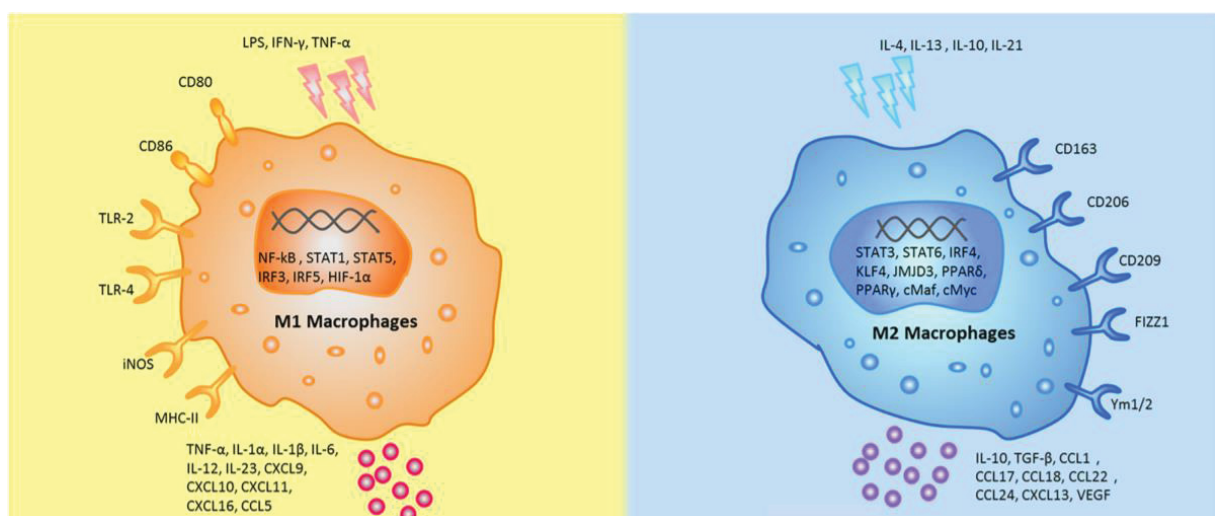
Uma vez que os macrófagos exibem diversos níveis de heterogeneidade e plasticidade, esses são fatores-chave em uma gama de patologias, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como na aterosclerose. Podem também participar no resgate de função, como ocorre durante a regeneração em organismos com alta capacidade regenerativa (VAROL; MILDNER; JUNG, 2015).

Em relação aos fenótipos, os macrófagos foram originalmente classificados em dois perfis: M1, que são células com características pró-inflamatórias, e M2, com características imunoregulatórias (MARTINEZ; GORDON, 2014). Devido as restrições que essas classificações apresentam, os macrófagos M2 foram mais tarde classificados de acordo com o papel desempenhado, como em cura de lesões (M2a), em processos relacionados à inflamações ou induzidos por imunocomplexos (M2b) e

processos regulatórios (M2c) (RÓSZER, 2015). Apesar desta, outra nomenclatura comum para os macrófagos foi proposta e que depende da fonte dessas células, baseando-se em uma coleção de marcadores ou de estímulos diferenciadores (MURRAY; ALLEN; BISWAS; FISHER *et al.*, 2014). Dessa forma, células M1 são intimamente relacionadas a células T Th1 CD4⁺, e células M2 relacionadas as respostas de células T Th2 CD4⁺. Macrófagos M1 são diferenciados por estimulação com LPS, IFN- γ ou IL-12, ou em resposta à inflamação aguda, enquanto células M2 podem ser diferenciadas por estimulação com IL-4 ou IL-13 (TACKE; ZIMMERMANN, 2014).

É interessante ressaltar que os diferentes fenótipos de macrófagos possuem diferentes funções, sendo as principais funções de macrófagos M1 a eliminação de agentes bacterianos, a atividade antiviral e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral, interleucina 1 β e as espécies reativas de oxigênio (EROs). Por sua vez, os macrófagos classificados como M2 promovem a defesa contra parasitos e podem estar envolvidos no reparo tecidual, além de participar em processos biológicos secretando mediadores imunomodulatórios como IL-10, TGF- β , IL-4 e IL-13 (RÓSZER, 2015). A polarização dos macrófagos nos subtipos M1 e M2 é melhor representada na FIGURA 1.

FIGURA 1 – ESTÍMULOS, MARCADORES DE SUPERFÍCIE E CITOCINAS SECRETADAS POR MACRÓFAGOS M1 e M2



FONTE: (YAO; XU; JIN, 2019). Modificado pela autora (2020).

A depender do cenário patológico, os macrófagos podem expressar marcadores correspondentes aos fenótipos M1 e M2 de forma simultânea, o que demonstra que essas células são altamente plásticas e que podem trafegar dentro do espectro entre as condições de M1 e M2 ao invés de serem células com características estáveis (CAO; HARRIS; WANG, 2015).

Durante lesões e infecções, macrófagos são ativados por PAMPs e DAMPs e começam a produzir e secretar mediadores antimicrobianos, citocinas e quimiocinas (JOUNAI; KOBIYAMA; TAKESHITA; ISHII, 2012). Uma reação exacerbada pode levar a um processo fibrótico que culmina em formação de cicatriz, e que tem, como consequência, perda de função. Nessas situações, torna-se fundamental que a população de macrófagos seja convertida para um fenótipo com características regulatórias ou anti-inflamatórias para que os danos colaterais ao tecido sejam evitados. Diversos mediadores convertem macrófagos a outros fenótipos, incluindo IL-4 e IL-13, conforme relatado anteriormente, o receptor $Fc\gamma$ e a via de sinalização TLR (ELLIOTT; HAMILTON, 2011).

Por fim, células regulatórias sintetizam substâncias como a arginase 1 (ARG1), IL-10, MMP13, CD200, maresinas, RELM α , IKK α e PD-L2, todas contribuindo para uma redução das respostas inflamatórias e para a resolução da fibrose. Adicionalmente, essas células também podem produzir CSF1, IGF1 e VEGF, que promovem a cura de lesões (KONING; VAN EIJK; POUWELS; BROUWER *et al.*, 2010; SERHAN; YANG; MARTINOD; KASUGA *et al.*, 2009). Esses sinais estão intimamente relacionados com a fase de recuperação da fibrose, durante a qual é induzida a degradação da matriz extracelular e a fagocitose dos miofibroblastos apoptóticos e de debris celulares, além da regulação das respostas imunes (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

2.2.1 Macrófagos no contexto regenerativo

Os macrófagos contribuem de diversas maneiras para a manutenção e recuperação da homeostasia tecidual. Eles estão presentes durante os processos de reparo e regeneração teciduais, e seus efeitos benéficos são atribuídos aos fatores trópicos que essas células liberam no ambiente celular (VAN GASSEN; STAELS; VAN OVERMEIRE; DE GROEF *et al.*, 2015). Por abordagens de depleção de macrófagos demonstrou-se que eles estão criticamente envolvidos no reparo tecidual após lesões

de pele, fígado, rins e músculos (CHAZAUD, 2014). Além disso, relata-se que peixes zebrafish mutantes com defeito mielóide apresentam apoptose em células regenerativas durante a regeneração da nadadeira caudal. Esse achado foi também relacionado à expressão prolongada de IL-1 β (HASEGAWA; HALL; CROSIER; ABE *et al.*, 2017).

Macrófagos possuem distintos perfis transcricionais, sendo eles relevantes para a manutenção da homeostasia metabólica (JANTSCH; BINGER; MÜLLER; TITZE, 2014). Após uma lesão, ao longo de todas as fases de reparo e fibrose, os macrófagos residentes e monócitos recém-recrutados começam a exibir programas altamente flexíveis e alteráveis de expressão gênica, além de respostas regulatórias importantes (MESCHER, 2017). Esses macrófagos são induzidos por citocinas para tornarem-se também fontes de citocinas, MMPs, quimiocinas e outros fatores que estão envolvidos em muitas etapas da resposta inflamatória (MESCHER, 2017).

Existe uma diferença importante entre o metabolismo dos macrófagos inflamatórios e anti-inflamatórios. Macrófagos inflamatórios possuem a via glicolítica aeróbica elevada e a via de pentose ativa, ao passo que o fenótipo anti-inflamatório é caracterizado pelo metabolismo oxidativo da glicose, representado pela oxidação de ácidos graxos, característica que possivelmente é responsável pela maior duração de suas funções (remodelamento e reparo teciduais) (LANGSTON; SHIBATA; HORNG, 2017). Outra característica diferencial entre os dois fenótipos dessas células é relacionada ao armazenamento de ferro, tendo os macrófagos M1 uma alta expressão de ferritina, enquanto que M2 expressam majoritariamente ferroportina, o principal exportador de ferro. Adicionalmente, a polarização para M1 induz o uso da arginina pela enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2) para a síntese de óxido nítrico, que elimina agentes exógenos. A polarização em M2 leva à conversão da arginina em poliaminas através da enzima arginase 1 (ARG1), enfatizando o papel desse fenótipo no remodelamento tecidual, uma vez que colabora com a síntese de colágeno e proliferação celular (CHAZAUD, 2014; DAS; SINHA; DATTA; ABAS *et al.*, 2015; VAN GASSEN; STAELS; VAN OVERMEIRE; DE GROEF *et al.*, 2015).

Macrófagos são encontrados em alto número em condições patológicas. No contexto de lesão ou infecção, DAMPs e PAMPs contribuem para o aumento no número de macrófagos pró-inflamatórios que levam muitas vezes a lesões mais extensas, inflamação exacerbada e formação de fibrose (LAND, 2015). Por outro lado, células apoptóticas e fatores anti-inflamatórios polarizam macrófagos para perfis anti-

inflamatórios que parecem ter capacidade regenerativa e atividade reparativa nos tecidos (CAO; HARRIS; WANG, 2015).

Macrófagos que infiltram em regiões de lesão são conhecidos por macrófagos de lesão. Vários estudos sugerem que a polarização dessas células é extremamente dinâmica e dependente do ambiente da lesão (BRANCATO; ALBINA, 2011; DALEY; BRANCATO; THOMAY; REICHNER *et al.*, 2010). Um estudo demonstrou que macrófagos de lesão tem características típicas de macrófagos classicamente e alternativamente ativados de forma concomitante e produzem majoritariamente citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL6) no dia 1 pós-lesão e TGF- β no dia 7. Em lesões estéreis, a indução da inflamação é bastante similar à causada por patógenos devido à indução da ativação por marcadores endógenos de dano, a exemplo da anfoterina (HMGB1), ferro, histonas ou ATP (DAS; SINHA; DATTA; ABAS *et al.*, 2015; LECH; ANDERS, 2013).

Na regeneração da nadadeira caudal do zebrafish adulto, um acúmulo transitório e precoce de macrófagos pró-inflamatórios é observada simultaneamente ao acúmulo de macrófagos anti-inflamatórios, com esses últimos permanecendo associados à nadadeira até o final do processo regenerativo (HASEGAWA; HALL; CROSIER; ABE *et al.*, 2017). A depleção química e genética de macrófagos indicou que essas células, que são recrutadas precocemente e que expressam TNF- α são críticas para a formação do blastema. Outro estudo reportou que a via de sinalização TNF- α /TNFR1 é necessária para a regeneração da nadadeira caudal ao revelar que seu receptor (TNFR1) possui papel direto na ativação da formação do blastema, sugerindo que o equilíbrio entre os subtipos de macrófagos proporciona sinais dessa citocina propícios para a regeneração em zebrafish (NGUYEN-CHI; LAPLACE-BUILHÉ; TRAVNICKOVA; LUZ-CRAWFORD *et al.*, 2017).

Em contraste com o zebrafish, outro teleósteo, o medaka (*Oryzias latipes*), demonstrou uma ausência de proliferação de cardiomiócitos e revascularização após lesão cardíaca, o que acarreta em respostas fibróticas excessivas e formação de cicatrizes (ITO; MORIOKA; KIMURA; TASAKI *et al.*, 2014). Realizou-se uma análise transcriptômica comparativa no contexto da lesão cardíaca e a partir dela, observou-se que respostas imunes agudas parecem ser diferentes entre as duas espécies de peixes teleósteos. Através de outra análise foi possível determinar que o zebrafish apresentou uma maior ativação nos genes relacionados com o sistema complemento, células B e T, macrófagos e fagocitose, enquanto o medaka demonstrou maior

ativação em genes envolvidos com ativação de neutrófilos e monócitos. O zebrafish também apresentou maior e mais duradoura ativação de genes relacionados à proliferação celular e angiogênese (LAI; MARÍN-JUEZ; MOURA; KUENNE *et al.*, 2017).

No modelo da nadadeira caudal em zebrafish adulto, o recrutamento de células do sistema imune inato, macrófagos e neutrófilos, foi bem estabelecido por imageamento *in vivo* (ELLETT; PASE; HAYMAN; ANDRIANOPOULOS *et al.*, 2011). Nadadeiras caudais embrionárias e larvais também possuem uma alta capacidade regenerativa (JOHNSON; WESTON, 1995; KAWAKAMI; FUKAZAWA; TAKEDA, 2004). Um estudo no modelo embrionário utilizou-se da depleção de macrófagos através da técnica com Morfolino para o fator regulatório interferon 8 (*irf8*) e sugeriu que essas células são necessárias para o crescimento e proliferação normais pós-lesão (JIN; LI; XU; ZHEN *et al.*, 2012; KEIGHTLEY; WANG; PAZHAKH; LIESCHKE, 2014).

Estudos recentes têm demonstrado que as células imunes são indispensáveis para a regulação dos sinais pró-inflamatórios e pró-regenerativos que levam à mudança do microambiente a favor da regeneração (CHENG; CHEN; CHOU; TANG *et al.*, 2017; HORCKMANS; RING; DUCHENE; SANTOVITO *et al.*, 2017; JULIER; PARK; BRIQUEZ; MARTINO, 2017; RODRIGUEZ; YIN, 2019). O papel dos macrófagos durante o processo regenerativo tem se destacado através da demonstração de sua função na remoção de neutrófilos por fagocitose, remoção essa que evita uma fase inflamatória prolongada na região da lesão (LAI; MARÍN-JUEZ; MOURA; KUENNE *et al.*, 2017). Além disso, essas células também são responsáveis pela mediação da fibrose cardíaca por sua capacidade de liberar diretamente proteínas de matriz e promover a proliferação e ativação de fibroblastos através da liberação de citocinas estimulatórias (PINTO; GODWIN; ROSENTHAL, 2014). De forma subsequente, para permitir a regressão da fibrose promovida, os macrófagos inativam os fibroblastos finalizando a resposta pró-fibrótica, e começam a liberar metaloproteinases para degradar a matriz extracelular que foi formada anteriormente (LEOR; PALEVSKI; AMIT; KONFINO, 2016).

Novas evidências sugerem que os macrófagos do zebrafish podem exercer diferentes funções durante as respostas imunes envolvidas na restauração de tecidos após infecção ou lesão. Um estudo recente distinguiu macrófagos periféricos de macrófagos residentes do tecido hematopoiético durante a regeneração da nadadeira

caudal ao encontrar diferenças no comportamento migratório entre essas duas populações de macrófagos. Além disso, reportou-se um papel específico dos macrófagos residentes na regeneração através da regulação de mediadores inflamatórios como a *il1b* e depleção de EROs na região da lesão (MORALES; ALLENDE, 2019).

2.2.2 Imunometabolismo de macrófagos

Sabe-se que os macrófagos são células complexas e que podem assumir uma ampla gama de funções na defesa do hospedeiro, homeostasia e reparo tecidual, patologia e desenvolvimento. Para que essas funções tão diferentes sejam acomodadas, essas células imunes adotam múltiplos estados de ativação, como salientado anteriormente. No contexto de uma regulação precisa da ativação dos macrófagos para que a função efetora seja exercida da maneira desejada, surge o campo do imunometabolismo, que tem sido o foco de diversos estudos nos últimos anos. Além do fornecimento de energia, as vias metabólicas também participam na regulação do fenótipo e função dos macrófagos. O metabolismo de aminoácidos alterado foi um dos primeiros atributos empregados para distinguir os subtipos de macrófagos. Macrófagos inflamatórios (M1 ou ativados por LPS+IFN γ) convertem a arginina em óxido nítrico (NO) através da atividade da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). Em contraste, os macrófagos M2 ou induzidos por IL-4 metabolizam esse aminoácido através da arginase-1 para síntese de poliaminas (VAN DEN BOSSCHE; O'NEILL; MENON, 2017).

Além dessa diferença no metabolismo da arginina entre os subtipos de macrófagos clássicos, os macrófagos M1 possuem alto metabolismo glicolítico e fosforilação oxidativa mitocondrial deficiente, enquanto o subtipo M2 tem a indução da fosforilação oxidativa pela IL-4, que apesar de mais lenta na geração de energia, sintetiza maiores quantidades de ATP por molécula de glicose (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016; PEARCE; PEARCE, 2013).

O fenótipo de macrófagos induzidos pela IL-4 é caracterizado e sustentado por um ciclo do ácido cítrico intacto e fosforilação oxidativa mitocondrial aumentada, em contraste com o que ocorre em macrófagos induzidos por LPS+IFN γ ou classicamente ativados (VAN DEN BOSSCHE; BAARDMAN; DE WINTHER, 2015). Um estudo demonstrou-se que ambos fenótipos apresentam glicólise aumentada,

porém somente acompanhada pela ativação da via das pentose-fosfato nos macrófagos induzidos por LPS+IFN γ (HASCHEMI; KOSMA; GILLE; EVANS *et al.*, 2012).

Interessantemente, uma enzima importante da via glicolítica, a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), participa na regulação da secreção de TNF. Quando a glicólise é limitada, essa enzima se liga ao RNAm e dessa forma controla sua tradução. Assim, o estado metabólico do macrófago regula a função da GAPDH como enzima glicolítica ou como uma repressora da tradução do RNAm do TNF (MILLET; VACHHARAJANI; MCPHAIL; YOZA *et al.*, 2016).

Por fim, a regulação positiva do metabolismo glicolítico em macrófagos induzidos por LPS+IFN γ além de produzir ATP como energia para sustento de suas funções fagocíticas e secretórias, também impulsiona a via das pentose-fosfato. Essa última via é ramificada da glicólise quando a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) decarboxila a glicose-6-fosfato (G6P) para formar ribose-5-fosfato (NAGY; HASCHEMI, 2015). Essa via, juntamente com a via glicolítica, são responsáveis, então, por sustentar as respostas inflamatórias dos macrófagos através da geração de aminoácidos para síntese proteica, de ribose para os nucleotídeos e de NADPH para a produção de espécies reativas de oxigênio (VAN DEN BOSSCHE; O'NEILL; MENON, 2017), que por sua vez, tem papéis altamente relevantes em processos regenerativos em diversos modelos animais (GAURON; RAMPON; BOUZAFFOUR; IPENDEY *et al.*, 2013; LOVE; CHEN; ISHIBASHI; KRITSILIGKOU *et al.*, 2013; TAN; SUDA, 2018).

2.3 SINALIZAÇÃO REDOX NA REGENERAÇÃO

Tecidos e órgãos funcionais tendem a manter um equilíbrio regulado entre oxidantes e antioxidantes. Os compostos oxidantes são aqueles capazes de gerar espécies reativas de oxigênio, como os radicais livres, enquanto os compostos antioxidantes eliminam as espécies de radicais e previnem que outras macromoléculas como DNA, lipídios e proteínas, sejam oxidadas. As reações induzidas por compostos oxidantes e antioxidantes são chamadas de reações redox (STHIJNS; VAN BLITTERSWIJK; LAPOINTE, 2018). O campo de sinalização redox é relativamente novo e se estabeleceu pela sobreposição dos estudos na área da biologia redox e de transdução de sinais. Foi descoberto ao longo do tempo que os

hidroperóxidos, em especial o peróxido de hidrogênio produzido por NADPH oxidases, e eletrófilos derivados da peroxidação lipídica ou do metabolismo, atuam na sinalização fisiologicamente relevante. Os mecanismos pelos quais esses hidroperóxidos participam da sinalização celular tornaram-se uma importante área de estudo, fornecendo informações sobre como essas moléculas reativas estão envolvidas nas principais vias de sinalização e regulação de fatores de transcrição (FORMAN, 2016).

Dessa forma, busca-se compreender os mecanismos de sinalização redox no contexto de regeneração de órgãos e tecidos. Um estudo realizado em anfíbios que possuem a habilidade de regenerar suas caudas após amputação, das espécies *Xenopus laevis* e *Xenopus tropicalis*, demonstrou que após a lesão há indução de uma síntese sustentada de EROs durante o processo regenerativo. A redução nos níveis de EROs por inibição farmacológica ou genética resultou em deficiência na regeneração e diminuição na proliferação celular. Adicionalmente, demonstrou-se que o aumento nos níveis de EROs após a amputação é necessário para a sinalização Wnt/ β -catenina e para a ativação de um de seus principais alvos *downstream* (*fgf20*), processos essenciais para a regeneração completa, concluindo que a produção de EROs induzida pela lesão é um regulador importante da regeneração tecidual (LOVE; CHEN; ISHIBASHI; KRITSILIGKOU *et al.*, 2013).

Um estudo no modelo de regeneração espontânea na espécie *Gekko japonicus*, também demonstrou o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na regeneração da cauda, com a inibição na síntese dessas espécies influenciando na formação de autofagia. A análise transcriptômica apresentou que a enzima NADPH oxidase 2 e as subunidades p40phox e p47phox estão relacionadas à síntese das espécies nesse modelo (ZHANG; WANG; MAN; ZHU *et al.*, 2016).

Em planárias (*Schmidtea mediterranea*), que são organismos capazes de regenerar o corpo inteiro, demonstrou-se que tanto em locais anteriores quanto posteriores a produção de EROs é necessária para uma regeneração adequada. Além disso, mostrou-se que a inibição da síntese dessas espécies influenciou no processo de diferenciação, reduzindo a formação de blastemas, e resultou em defeitos de regeneração do sistema nervoso e no processo de padronização (PIROTTE; STEVENS; FRAGUAS; PLUSQUIN *et al.*, 2015).

A forma pela qual os animais com capacidade regenerativa sinalizam o insulto inicial em um tecido e transformam esses sinais em recuperação funcional é uma

questão pouco compreendida. Um estudo demonstrou, ao utilizar o modelo de regeneração da nadadeira caudal em larvas de zebrafish, que a proteína Lyn, da família Src quinase (SFK), funciona como um sensor redox em leucócitos, detectando H_2O_2 nos locais de lesão (YOO; FREISINGER; LEBERT; HUTTENLOCHER, 2012).

Outro estudo nesse mesmo modelo, dessa vez empregando animais transgênicos para um sensor de peróxido de hidrogênio, demonstrou que após a amputação da nadadeira há um aumento na concentração da molécula na margem da lesão, que se inicia nos primeiros 3 minutos e apresenta um pico aos 20 minutos após a amputação, e que se estende entre 100 a 200 micrômetros no epitélio da nadadeira caudal adentro, em um gradiente decrescente de concentração. Através de inibição genética e farmacológica, esse estudo apresentou que o gradiente é produzido pela enzima dual oxidase (Duox), e que esse sinal é necessário para o recrutamento de leucócitos em direção à lesão (NIETHAMMER, 2018; NIETHAMMER; GRABHER; LOOK; MITCHISON, 2009).

Em modelo de amputação da nadadeira no zebrafish adulto demonstrou-se que a produção de EROs é bem regulada em relação ao tempo e espaço, por pelo menos 24 horas. No tecido regenerativo, existem duas vias distintas ativadas em paralelo por essas espécies reativas. Uma via é responsável por eventos apoptóticos e outra pela ativação da JNK. Ambos eventos estão envolvidos na proliferação compensatória de células epidérmicas, e são necessários para a progressão da regeneração. Também, eles têm influência nas vias Wnt, SDF1 e IGF. Esses dados implicam no estresse oxidativo durante o processo regenerativo, diferentemente do que acontece em modelos de *wound healing* (GAURON; RAMPON; BOUZAFFOUR; IPENDEY *et al.*, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

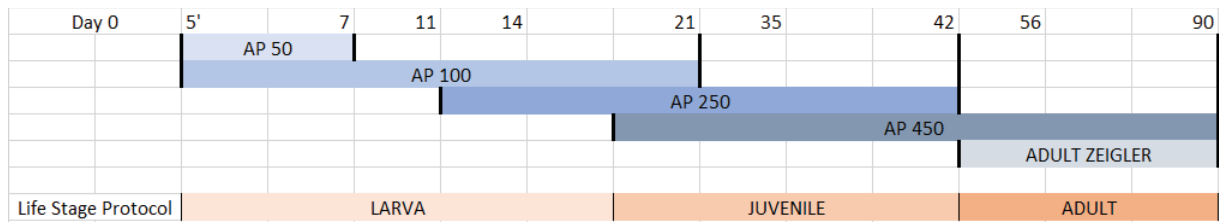
3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Todas as experimentações animais descritas no presente estudo foram conduzidas na Universidade Federal do Paraná e foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA/BIO – UFPR) sob os números de 1217 e 1218, certificando que os procedimentos utilizados estão de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Cuidado e Uso de Animais para fins Científicos e de Ensino, estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as diretrizes internacionais para experimentação animal.

3.2 LINHAGENS E MANUTENÇÃO DOS PEIXES

Peixes adultos zebrafish (*Danio rerio*) das linhagens WT (AB), Tg (lyz:dsRed/mpx:GFP) e Tg (mpeg1:mCherry/tnfa:GFP), doados pelo biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, foram mantidos em aquários em uma densidade de 3 peixes/L de água, em ciclos claro-escuro de 14:10h e em temperatura ambiente de 30°C no Laboratório de Toxicologia Ambiental, localizado no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná. Os peixes adultos e as larvas a partir do quinto dia pós-fertilização (5 dpf) foram alimentadas duas vezes ao dia com *Zeigler Larval Diet* nas granulações AP 50, 100, 150 e 450 de acordo com seu estágio de desenvolvimento, conforme detalhado na FIGURA 2, e náuplios de artêmia uma vez ao dia a partir do vigésimo primeiro dia de idade (21 dpf). Para os ensaios experimentais, os animais foram dispostos em uma proporção de 3 fêmeas para 2 machos (3:2) em tanques de reprodução ao final da tarde e os ovos foram coletados na manhã seguinte. Coletaram-se e dispuseram-se os embriões em placas de Petri contendo meio E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄) suplementado com azul de metileno 0.05%. Os embriões e larvas foram estadiados de acordo com (KIMMEL; BALLARD; KIMMEL; ULLMANN *et al.*, 1995).

FIGURA 2 – PROTOCOLO DE ALIMENTAÇÃO DO ZEBRAFISH



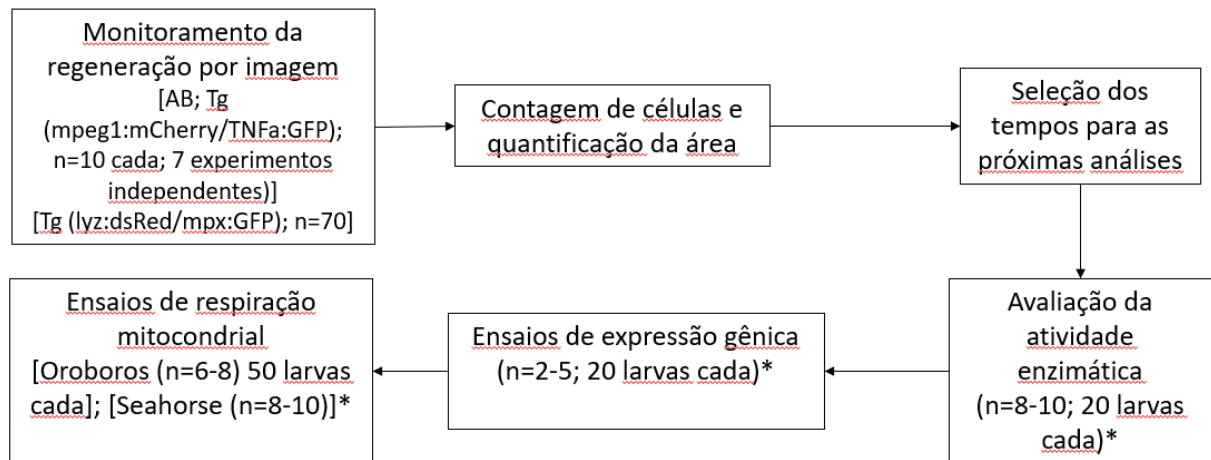
FONTE: A autora (2020).

Legenda: protocolo de alimentação ilustrando quais granulações de ração seca (AP 50, 100, 250 e 450) devem ser administradas para diferentes idades do zebrafish, em dias pós-fertilização.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A metodologia desenvolvida e executada no presente estudo está disposta resumidamente a seguir, na FIGURA 3.

FIGURA 3 – METODOLOGIA EMPREGADA NO ESTUDO DE REGENERAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL EM LARVAS DE ZEBRAFISH



FONTE: A autora (2020).

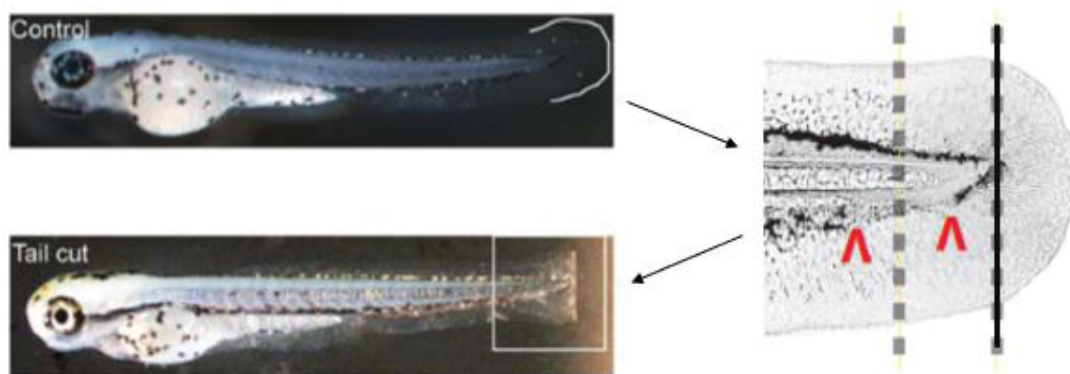
Legenda: metodologias utilizadas no estudo da regeneração na cauda das larvas de zebrafish. O asterisco (*) denota o uso de quatro grupos distintos nas análises, que compreende dois grupos em diferentes tempos pós-amputação, e dois grupos controle com a mesma idade dos animais amputados.

3.4 ENSAIOS DE REGENERAÇÃO E IMAGEAMENTO

Para a amputação da porção final da cauda das larvas de 3 e 5 dpf, as larvas foram anestesiadas com triclaína 0.016% (etil 3-aminobenzoato, Sigma-Aldrich, França) em meio E3 e então dispostas em uma placa de Petri. A transecção da cauda

foi realizada em um microscópio estereoscópio Stemi 508 (Zeiss) com o auxílio de um bisturi estéril. As amputações foram executadas na região próxima e posterior à notocorda, conforme demonstrado pela linha contínua na FIGURA 4. Para o acompanhamento da regeneração e infiltração de células do sistema imune foi realizado o imageamento das larvas com a objetiva de 20x em um microscópio confocal invertido A1R Multiphoton + Nikon, disponível no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência, localizado na UFPR. Para isso, as larvas foram anestesiadas com tricáína 0.016% e posicionadas em placas com fundo de vidro ou em lâminas histológicas no caso da utilização do estereomicroscópio de fluorescência Zeiss Axio Zoomv16. As imagens foram adquiridas pela captura de projeções Z com intervalos de 0.5 μm e processadas posteriormente utilizando o software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Projeções Z de intensidade máxima foram geradas e as células marcadas positivamente para os marcadores pré-estabelecidos foram contabilizadas, além da área em regeneração ser quantificada. Para a contagem de neutrófilos (lyz+/mpx+), células foram contabilizadas quando localizadas em até 300 μm da lesão.

FIGURA 4 – ILUSTRAÇÃO DA AMPUTAÇÃO DA PORÇÃO FINAL DA NADADEIRA CAUDAL EM LARVA DE ZEBRAFISH



FONTE: Adaptado de (ROMERO; MCCATHIE; JANKUN; ROEHL, 2018).

Legenda: esquema de amputação da porção final da nadadeira caudal em larvas de zebrafish com 3 dias pós-fertilização. A amputação é feita próxima à notocorda, com o corte delimitado pela linha contínua preta. As setas vermelhas indicam outros planos de corte para modelos de amputação da cauda.

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E RT-PCR

As amostras foram coletadas consistindo de agrupamentos de 20 larvas cada. O RNA foi isolado dessas amostras utilizando-se o reagente TRIzol seguindo-se as

instruções do fabricante. Após a precipitação e lavagem do RNA total, as concentrações de RNA foram determinadas a 260 nm com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (ThermoScientific NanoDrop). Alíquotas de 30 µL foram armazenadas em um freezer a -80 °C. Para a síntese de cDNA, 2 µg do RNA total obtido foram incubados em DNase I Buffer e tratados com 1 µL RNase-Free DNase por 15 minutos a 25 °C. Então, 0.5 µM OligodT e 1 µL de 20 mM EGTA foram adicionados e incubados por 10 minutos a 65°C, seguidos de 5 minutos a 4 °C. 1 µL BSA, 1x M-MLV Buffer, 10 µl 10 mM desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) e 2 µl M-MLV enzima transcriptase reversa foram adicionados e aquecidos novamente a 37 °C por 1 hora e a 65 °C por 10 minutos. Por fim, as amostras de cDNA foram diluídas 1:4 para uso nas reações. As análises de expressão gênica foram conduzidas utilizando o SYBR Master-mix. Para a reação foram utilizados 5 µL de SYBR Master-Mix, 0.5 µL de cada iniciador, 4 µL de cDNA, completando o volume de reação para 10 µL com água ultrapura (DEPC). A amplificação foi realizada no equipamento 7300 Applied Biosystems. As curvas de *melting* foram utilizadas como controle de estabilidade de primer. A expressão relativa foi calculada pelo método de $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e o gene endógeno empregado foi o EF1 α (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, like 1*). Para o estudo foram analisadas as expressões dos genes *tnfa*, *il1b*, *inos* e *arg1*, como marcadores que distinguem células M1 de M2.

3.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Larvas com 4 e 8 dpf, e com 1 e 5 dpa (dias pós-amputação) foram separadas em amostras contendo 20 larvas e em seguida armazenadas em freezer -80°C. Então, as amostras foram homogeneizadas por cinco minutos em 300 µL tampão de fosfato de potássio 0.1M, pH 7 a 4°C utilizando-se um disruptor ultrassônico. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 15.000xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido em alíquotas para cada um dos ensaios. A quantificação proteica foi realizada de acordo com o método de Bradford utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão (CHEN; ZENG; CAO, 2012). Unidades de superóxido dismutase (SOD) foram determinadas pelo método que envolve o uso de pirogallol (C₆H₆O₃), um composto fenólico capaz de auto-oxidação e que é inibido na presença da atividade

da SOD nas amostras, permitindo a medição indireta da atividade enzimática em 440 nm, conforme método descrito na literatura (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

Para determinar a atividade da catalase foi empregado um método que se baseia no consumo do peróxido de hidrogênio pela enzima, levando à uma diminuição na absorbância detectada em 240 nm (AEBI, 1984). Os níveis de peroxidação lipídica foram quantificados por FOX, um método químico que tem como princípio a oxidação rápida mediada por peróxido do íon Fe^{2+} para Fe^{3+} sob condições ácidas. O íon gerado forma um complexo com o alaranjado de xilenol adicionado na solução, levando a alteração na medição de absorbância em 560 nm (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992).

3.7 RESPIROMETRIA

Com o intuito de investigar a respiração mitocondrial em larvas de zebrafish durante o processo regenerativo, nos tempos de 1 e 5 dpa, empregou-se a técnica de respirometria no equipamento Oroboros O2k. Para isso, após a calibragem do respirômetro e configuração da movimentação do agitador, amostras nos tempos de 1 e 5 dpa; e nos tempos de 4 e 8 dpf, contendo 50 larvas cada, foram adicionadas nas câmaras do respirômetro. Leituras por cerca de 3 minutos foram realizadas para medição da respiração basal, seguidas de medições após as injeções de oligomicina, CCCP e antimicina A, em concentrações finais de 0,5; 3 e 1 μM , respectivamente. As larvas então foram lavadas do equipamento com a utilização de álcool 70% por 10 minutos, e com água destilada, a fim de preparar as câmaras para as próximas análises.

3.8 RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO

No ensaio para avaliação da respiração mitocondrial utilizou-se o equipamento Seahorse XF24 Analyzer (Agilent) com as microplacas Seahorse XF 24 Islet Capture, que são microplacas de 24 poços apropriadas para ensaios celulares com ilhotas pancreáticas ou embriões de zebrafish. O protocolo utilizado foi uma adaptação e consistiu no plaqueamento das larvas com 8 dpf individualmente em 20 dos 24 poços disponíveis após adição de 700 μL de meio E3, utilizando os poços remanescentes como controle (somente meio E3). No cartucho, previamente calibrado, foram adicionados 70 μL das drogas oligomicina, CCCP e antimicina

A/rotenona, nas portas A, B e C, em concentrações finais previamente calculadas de 1 e 0.5 μM para oligomicina, 2.5 e 5.0 μM para CCCP e de 1 μM para antimicina A/rotenona. O equipamento foi então configurado para as medições, homogeneizações e tempos de espera conforme protocolo de Gibert e colaboradores (BOND; MCEWEN; YOGANANTHARAJAH; GIBERT, 2018).

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. Quando a comparação foi feita entre mais de dois grupos experimentais e a distribuição normal não foi observada, ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn foram empregados para testar a significância. Por sua vez, quando a comparação era entre dois grupos experimentais o teste t-student foi aplicado. Todas as análises estatísticas foram executadas no software Graphpad Prism v7.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

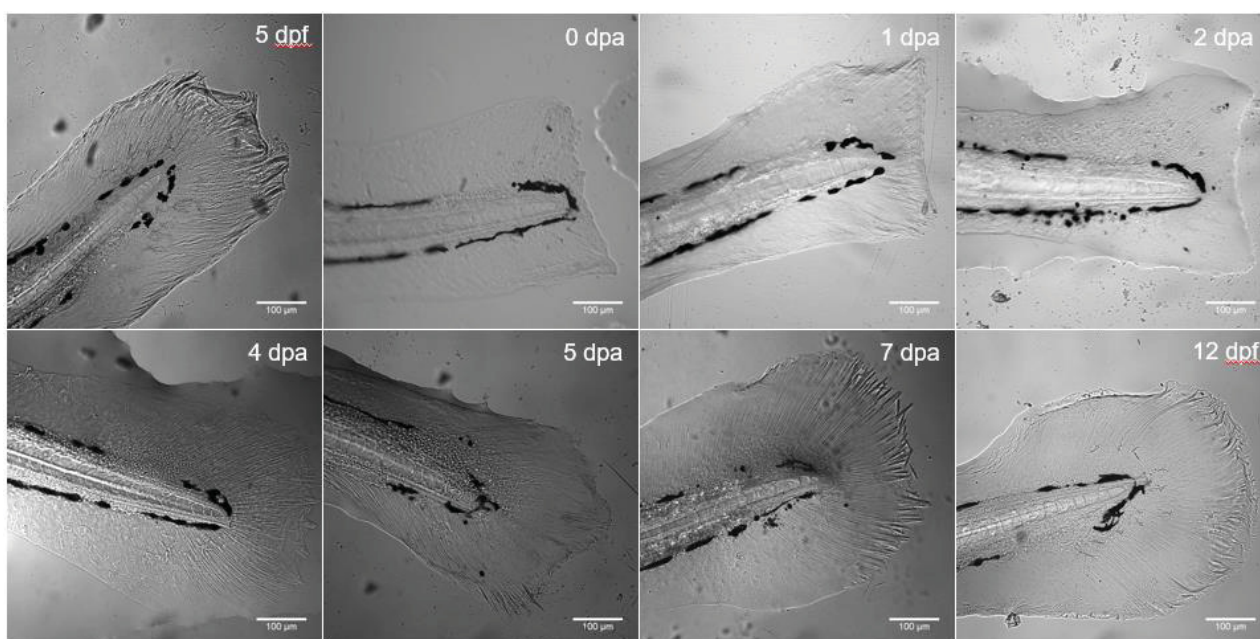
4.1 O PROCESSO REGENERATIVO ESTÁ COMPLETO 7 DIAS PÓS-AMPUTAÇÃO E OS NEUTRÓFILOS SÃO RAPIDAMENTE RECRUTADOS PARA O LOCAL DA LESÃO

Após a amputação da nadadeira caudal das larvas de zebrafish, a camada epidérmica e o blastema – tecido altamente proliferativo que contém uma massa de células indiferenciadas – são prontamente estabelecidos, seguido, em poucas horas, da fase de recuperação em termos de comprimento da nadadeira (PFEFFERLI; JAŻWIŃSKA, 2015). Como pode ser demonstrado na FIGURA 5 e no GRÁFICO 1, a regeneração completa é alcançada em 7 dias pós-amputação (dpa), quando a nadadeira caudal regenerada é de tamanho similar as nadadeiras não-amputadas de larvas de mesma idade. A fase de recuperação após a transecção é gradual, como visualizado no GRÁFICO 2. No dia 0, ou seja, imediatamente após a amputação, a porcentagem de área calculada da região da notocorda até a margem da nadadeira caudal resultou em um valor médio de 19.18, com 100.00 correspondendo à mesma região em larvas não-amputadas. Em 1 dpa foi demonstrado um aumento do valor médio para 30.93, com a área regenerada mostrando então um crescimento de 11.75% se comparado com larvas não-amputadas de mesma idade. No dia 3 (3 dpa), a área em regeneração saltou de 16,89 para 39,6 (valores médios), representando o maior pico de crescimento em um intervalo de 24 horas (22.71 pontos ou um aumento de 134.46% de 2 para 3 dpa). Por sua vez, em 5 dpa observou-se o menor crescimento em área, com 49.3, que assinalou um aumento de 4.54 em área ou de 10.2% no intervalo entre 4 e 5 dias pós-amputação. A regeneração gradual também pode ser observada no GRÁFICO 2, no qual a regeneração é expressa em μm^2 de área.

Para a avaliação da infiltração de neutrófilos, a linhagem de zebrafish Tg (lyz:dsRed/mpx:GFP) foi empregada e a estratégia de contagem celular utilizada foi a contabilização de células dsRed⁺/GFP⁺ quando essas estavam localizadas em uma distância máxima de 300 μm da margem da lesão. Assim, como apresentado na FIGURA 6 e no GRÁFICO 3, as células positivas para ambos marcadores, que identificam usualmente neutrófilos, são identificadas no local da lesão em 1 hora pós-amputação (hpa), apesar da infiltração ser muito mais evidente de 7 a 24 hpa, seguida

de um decréscimo em 168 hpa (7 dias pós-amputação). Além disso, entre 1 e 7 hpa houve um acréscimo de aproximadamente 4.5 vezes no número de neutrófilos infiltrantes na margem da lesão. Em 7 hpa, demonstrou-se o pico de infiltração dessas células, com um número médio de 7.55 células, seguindo de uma diminuição de 70 e 22.5% nos tempos de 24 e 168 hpa, respectivamente, sugerindo que a inflamação dirigida por neutrófilos é superada rapidamente dentro das primeiras 24 horas após a lesão na nadadeira caudal do zebrafish. A migração reversa de neutrófilos é um mecanismo bastante reportado e sugere-se que esse processo é mediado por contato célula-célula entre neutrófilos e macrófagos na lesão. Dessa forma, buscou-se investigar a infiltração de macrófagos no local da lesão.

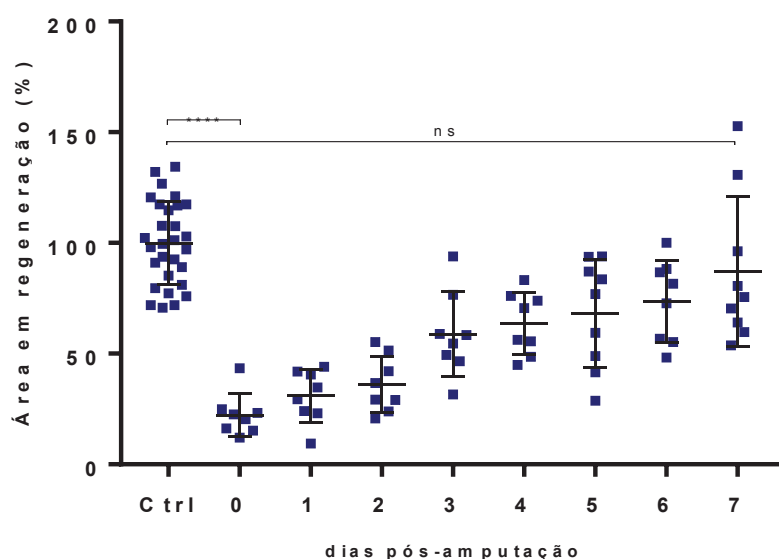
FIGURA 5 – NADADEIRAS CAUDAIS DE LARVAS DE ZEBRAFISH EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-FERTILIZAÇÃO E PÓS-AMPUTAÇÃO



FONTE: A autora (2020).

Legenda: Larvas de zebrafish com 5 dias pós-fertilização (dpf) tiveram suas nadadeiras caudais amputadas (n= 8-30) e foram observadas até o sétimo dia pós-amputação (dpa) ou até o décimo segundo dia pós-fertilização através da aquisição de imagens em microscópio confocal invertido para acompanhamento do crescimento em área. Imagens representativas da nadadeira caudal de larvas de zebrafish em diferentes tempos: 5 dpf, 0, 1, 2, 4, 5, 7 dpa e 12 dpf, respectivamente, permitindo a visualização da região da lesão próxima à notocorda em 0 dpa e a regeneração completa em 7 dpa quando comparada com larvas em 12 dpf.

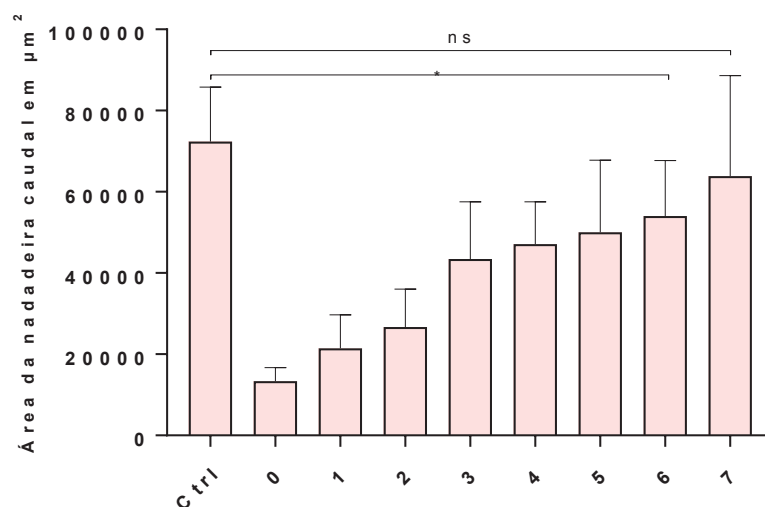
GRÁFICO 1 – ÁREA DA NADADEIRA CAUDAL EM REGENERAÇÃO NORMALIZADA PARA PORCENTAGEM (%) EM RELAÇÃO A NADADEIRAS NÃO AMPUTADAS



FONTE: A autora (2020).

Legenda: o gráfico demonstra a área em recuperação de crescimento mensurada do local de amputação (próximo à notocorda) em direção a extremidade da nadadeira caudal. A regeneração é finalizada em termos de crescimento em 7 dpa. Diferenças estatísticas entre o tempo de 0 dpa e larvas controle foram encontradas, na qual **** $P < 0.0001$; e não foram encontradas diferenças entre o tempo 7 dpa e controle, com ns igual a $P < 0.7327$ ajustado. A quantificação foi mensurada através do software ImageJ e os dados foram normalizados ao se comparar cada grupo com seu controle (animais de mesma idade) e então convertidos para porcentagem de regeneração.

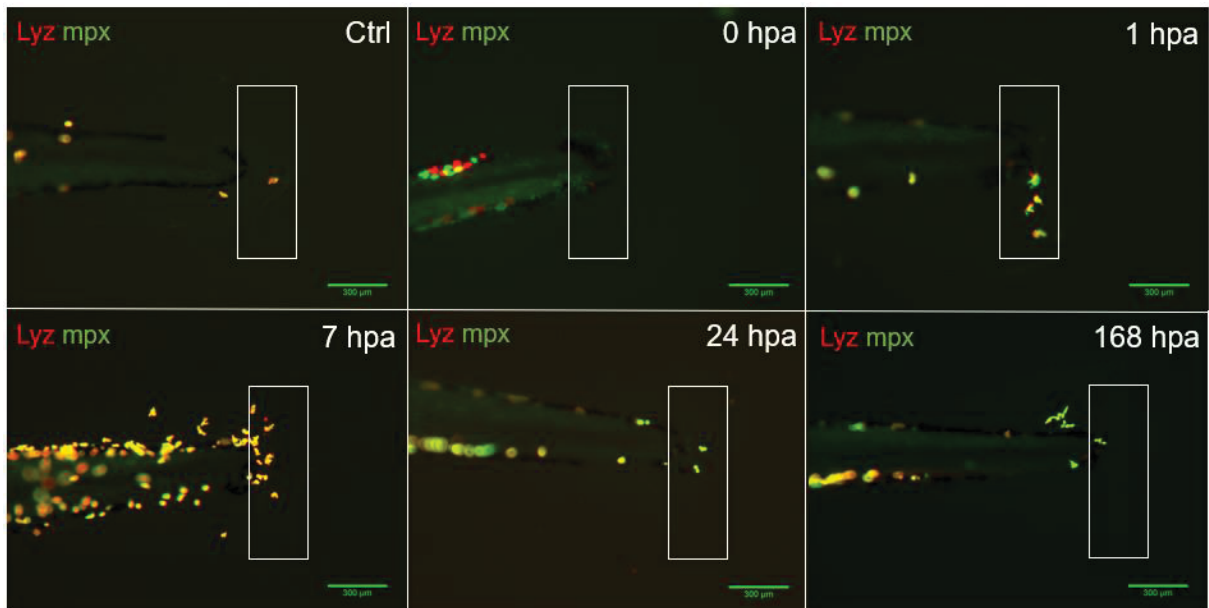
GRÁFICO 2 – ÁREA DA NADADEIRA CAUDAL EM REGENERAÇÃO EXIBIDA EM MICRÔMETROS QUADRADOS (μm^2)



Fonte: A autora (2020).

O gráfico representa o crescimento da nadadeira caudal expresso em área (μm) em animais controle e em animais que foram submetidos à amputação de suas nadadeiras e acompanhados do instante da transecção (0 dpa) até 7 dpa. O monitoramento indica uma recuperação gradual da nadadeira. A quantificação foi mensurada através do software ImageJ. Não foram encontradas diferenças estatísticas (ns) entre os grupos controle e 7 dpa ($P < 0.8137$ ajustado) e diferenças entre o grupo controle e os demais grupos foram observadas, em destaque para o dia 6 (*; $P < 0.0419$).

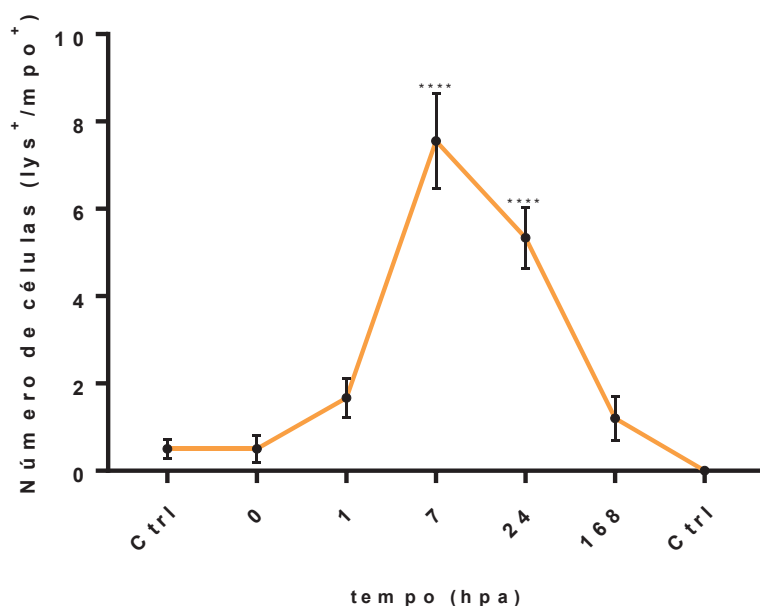
FIGURA 6 – NEUTRÓFILOS INFILTRANTES NA LESÃO REGENERATIVA DA NADADEIRA CAUDAL DO ZEBRAFISH (CÉLULAS *lyz*+/*mpx*+)



FONTE: A autora (2020).

Legenda: Larvas de zebrafish foram submetidas à amputação da nadadeira caudal e foram observadas de 0 a 7 dpa através de aquisição de imagens de fluorescência. As imagens foram analisadas e as células positivas para os marcadores (Tg *lyz*:dsRed/*mpx*:GFP), que estivessem localizadas dentro dos quadrantes delimitados conforme exposto nas imagens acima, foram contabilizadas no software ImageJ. Imagens representativas de larvas de zebrafish em diferentes tempos: 3 dpf como controle, 0, 1, 7, 24 e 168 hpa, indicando um aumento na infiltração de neutrófilos seguido de uma diminuição entre 24 e 168 hpa.

GRÁFICO 3 – NEUTRÓFILOS INFILTRANTES NA LESÃO REGENERATIVA (300 μ m) DA CAUDA DE ZEBRAFISH



FONTE: A autora (2020).

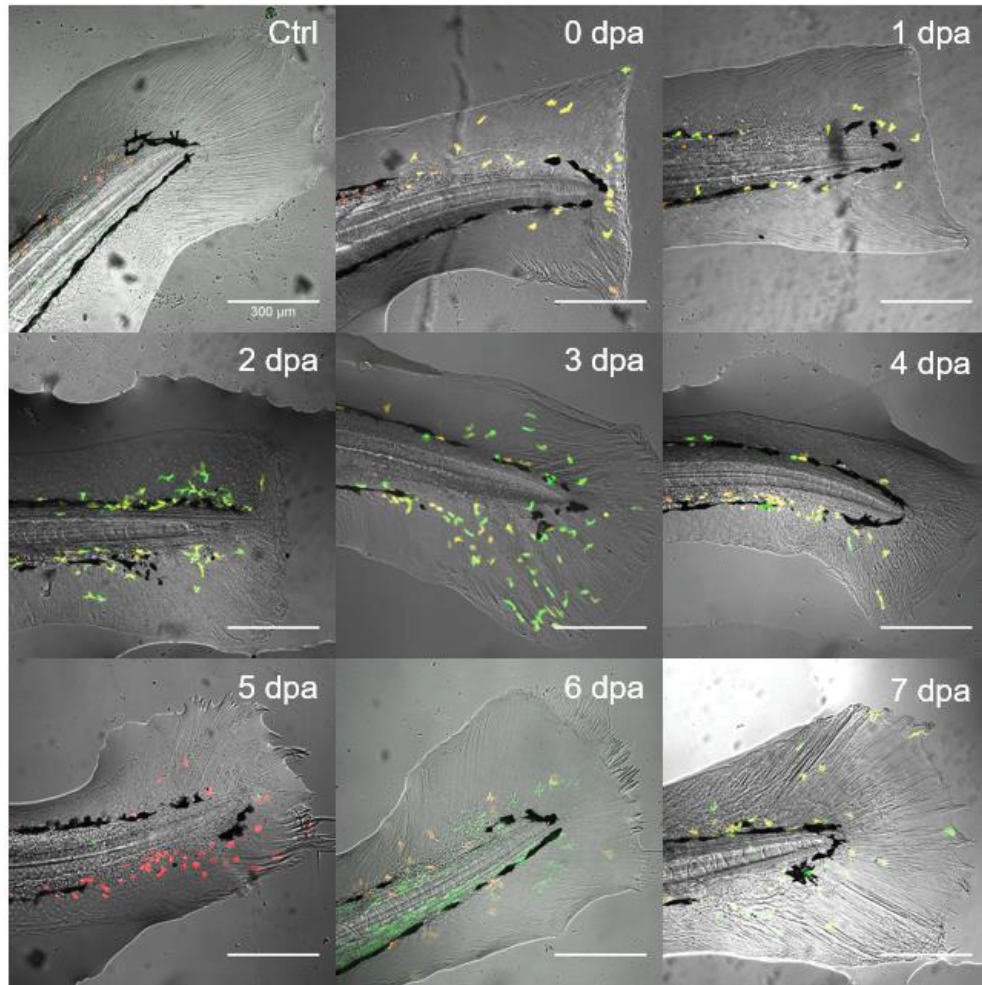
Legenda: O gráfico representa a infiltração de neutrófilos da margem da lesão até 300 μ m em direção à notocorda (n=9-10). É demonstrado um aumento evidente no número de neutrófilos de 0 para 7 hpa, seguido de resolução da inflamação mediada por essas células até 168 hpa. ****p<0.0001; indica diferenças estatísticas dos tempos 7 e 24 hpa com os demais tempos (controle, 0, 1 e 168 hpa).

4.2 EM 5 DIAS PÓS-AMPUTAÇÃO HÁ UM PICO DE MACRÓFAGOS PRÓ-RESOLUTIVOS

Larvas de zebrafish da linhagem Tg (mpeg1:mCherry/TNFa:GFP) permitiram o estudo da dinâmica de infiltração de diferentes subtipos de macrófagos. Macrófagos M1 são representados por células duplo-positivas e macrófagos M2 são marcados apenas por mCherry. Dessa maneira, foi demonstrado que macrófagos pró-inflamatórios infiltram e persistem de 1 dpa até 7 dpa, como pode ser observado nas FIGURAS 7 e 8A. Adicionalmente, macrófagos M2 ou pró-resolutivos (células mpeg1⁺/tnfa⁻) tiveram um aumento pronunciado na infiltração no dia 5 (5 dpa), como pode ser verificado na FIGURA 8B. De maneira complementar, poucos ou nenhum macrófago pró-inflamatório foram visualizados nesse estágio. Macrófagos são células fagocíticas que exibem uma alta plasticidade, alterando seu fenótipo e funções de acordo com o microambiente tissular, mecanismos epigenéticos e vias de sobrevivência celular, que

prolongam ou encurtam o desenvolvimento e viabilidade dos macrófagos (SHAPOURI-MOGHADDAM; MOHAMMADIAN; VAZINI; TAGHADOSI *et al.*, 2018). Baseado na ativação dessas células, elas podem apresentar fenótipos M1 ou M2. Fatores anti-inflamatórios e células em processo apoptótico induzem macrófagos para um perfil anti-inflamatório (M2), fenótipo esse que parece ter capacidade regenerativa e atividade de reparo tecidual (SZONDY; SARANG; KISS; GARABUCZI *et al.*, 2017). No modelo desenvolvido nesse estudo, macrófagos anti-inflamatórios se demonstram presentes em 5 dpa. Antes disso, há uma distribuição do infiltrado pró-inflamatório aparentemente homogênea, caracterizada pela expressão de ambos marcadores fluorescentes, mCherry para o mpeg1 e GFP para tnfr. Adicionalmente, contabilizou-se o número de macrófagos infiltrantes (células mpeg1+) na lesão regenerativa distantes até 300 um do plano de amputação. Nesse ensaio, foi demonstrado que há um aumento no infiltrado total de macrófagos, predominante em 2 dpa, com posterior resolução em 6 dpa, conforme apresentado no GRÁFICO 4.

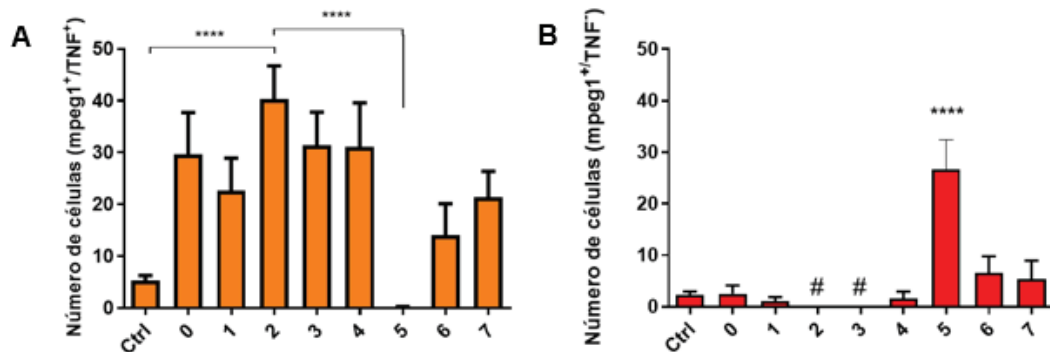
FIGURA 7 – MACRÓFAGOS INFILTRANTES NO LOCAL DA LESÃO REGENERATIVA



FONTE: A autora (2020).

Imagens representativas dos grupos controle, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias pós-amputação da nadadeira caudal, demonstrando a infiltração de células M1 e M2 [Tg(mpeg1:mCherry/tnfa:GFP)].

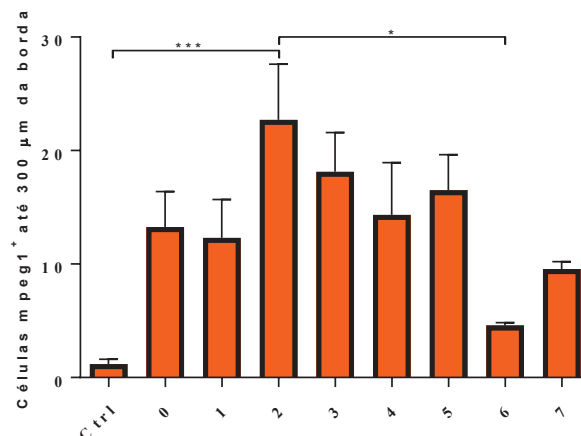
FIGURA 8 – NÚMERO DE MACRÓFAGOS NA LESÃO REGENERATIVA NA NADADEIRA CAUDAL DO ZEBRAFISH



FONTE: A autora (2020).

Legenda: (A) Contagem de células fagocíticas expressando tanto mCherry, quanto GFP (mpeg1⁺/tnfa⁺) indicam ativação e polarização de macrófagos classificados como M1. As células foram contabilizadas no software ImageJ a partir de imagens obtidas de animais controle e animais com a nadadeira caudal amputada em 0 hpa até o sétimo dia após a cirurgia de transsecção (n= 6-28). ****p<0.0001 em 2 dpa indica diferenças estatísticas no infiltrado celular (One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni) comparado com os grupos controle e 5 dpa. (B) Contagem de macrófagos M2 (mpeg1⁺/TNFa⁻), expressando exclusivamente mCherry, que demonstra a polarização de macrófagos para o perfil M2, denominado também anti-inflamatório ou pró-resolutivo (n= 6-27). # indica tempos nos quais células mpeg1⁺/TNFa⁻ não foram detectadas. ****p<0.0001 em 5 dpa representa diferenças estatísticas entre 5 dpa e demais tempos.

GRÁFICO 4 – INFILTRAÇÃO DE MACRÓFAGOS TOTAIS DURANTE O PROCESSO REGENERATIVO DA NADADEIRA CAUDAL



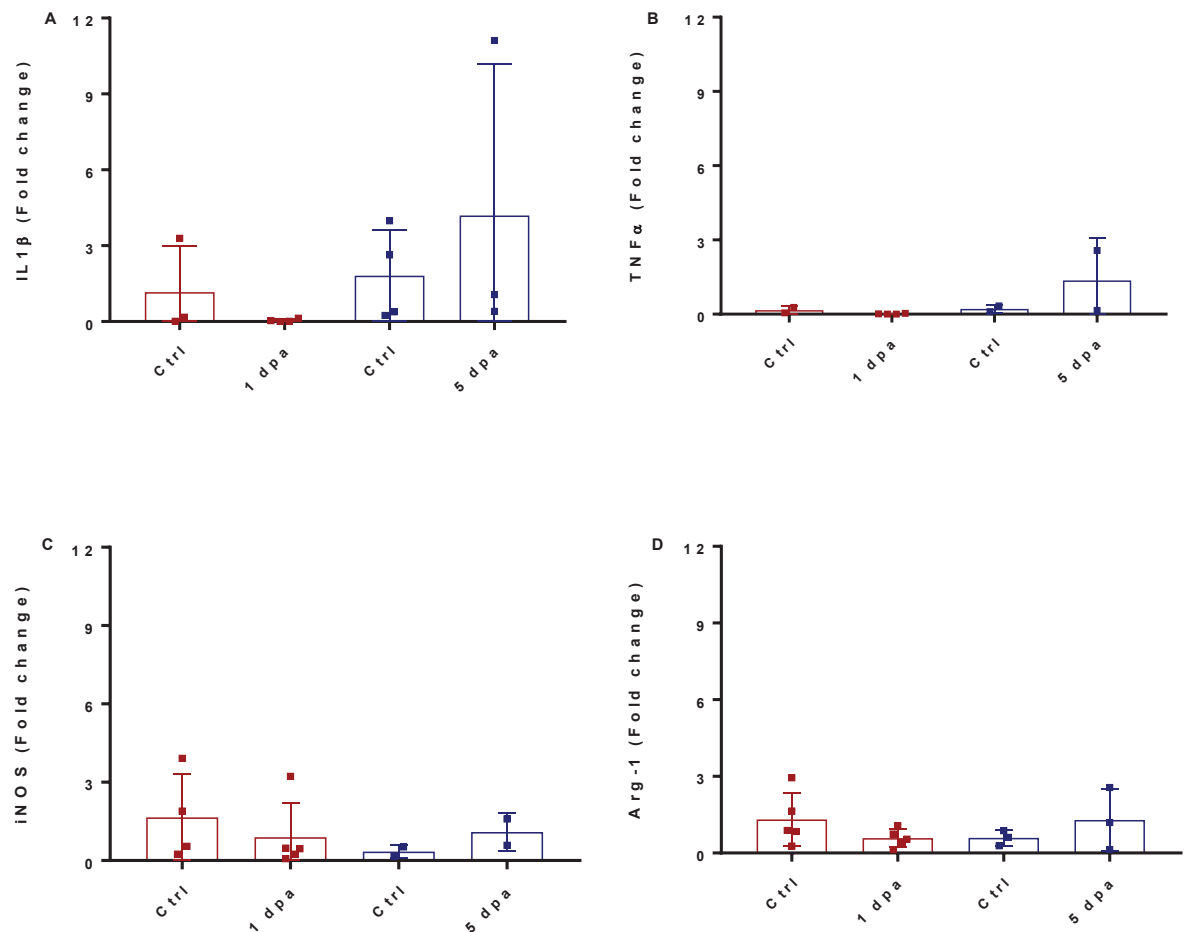
FONTE: A autora (2020).

Legenda: Contagem de células fagocíticas expressando mCherry (mpeg1⁺), indicando o recrutamento de macrófagos em direção à lesão. As células foram contabilizadas no software ImageJ a partir de imagens obtidas de animais controle e animais com a nadadeira caudal amputada em 0 hpa até o sétimo dia após a cirurgia de transsecção (n= 5-10). ***p<0.001 em 2 dpa indica diferenças estatísticas no infiltrado celular (One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni) comparado com o grupo controle. *p<0.05 em 6 dpa representa diferenças estatísticas entre 6 dpa e 2 dpa, demonstrando uma diminuição significativa no infiltrado celular.

4.3 A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO NÃO É ALTERADA AO LONGO DA REGENERAÇÃO

Após a observação do infiltrado de diferentes subpopulações de macrófagos em diferentes tempo, larvas de zebrafish foram submetidas à eutanásia e coletadas nos dias 1 e 5 pós-amputação e nos dias 4 e 8 pós-fertilização – idade das larvas controle não-amputadas – para análise por RT-PCR dos genes relacionados à inflamação IL-1 β e TNF α , e de genes relacionados ao metabolismo de macrófagos, como óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e arginase-1 (Arg1). Células M2 regulam positivamente a Arg-1 e reduzem os níveis de EROs e óxido nítrico (NO) (VIOLA; MUNARI; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ; SCOLARO *et al.*, 2019) e liberam citocinas anti-inflamatórias, fatores de crescimento e poliaminas, levando à recuperação do tecido e sua regeneração (MANTOVANI; BISWAS; GALDIERO; SICA *et al.*, 2013). Células M1, por outro lado, produzem iNOS, citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α , etc. (DE SANTA; VITIELLO; TORCINARO; FERRARO, 2018). Apesar disso, não foram detectadas diferenças na expressão de RNAm ao serem comparados os animais em 1 e 5 dpa com seus respectivos controles (FIGURA 9).

FIGURA 9 – EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO E AO METABOLISMO DE MACRÓFAGOS



FONTE: A autora (2020).

Legenda: A expressão de RNAm relativos aos genes relacionados à inflamação e metabolismo não é alterada ao longo do processo regenerativo. Expressão relativa de mRNA dos dias 1 e 5 pós-amputação comparada aos seus respectivos controles para os genes (A) IL1 β , (B) TNF α , (C) iNOS e (D) Arg1. Diferenças estatísticas não foram observadas entre 1 dpa e 4 dpf e entre 5 dpa e 8 dpf para nenhum dos genes. Os dados de qPCR foram normalizados em relação à expressão de ef1a1 (n= 2-5 replicatas por grupo em cada experimento, considerando 20 larvas para cada replicata).

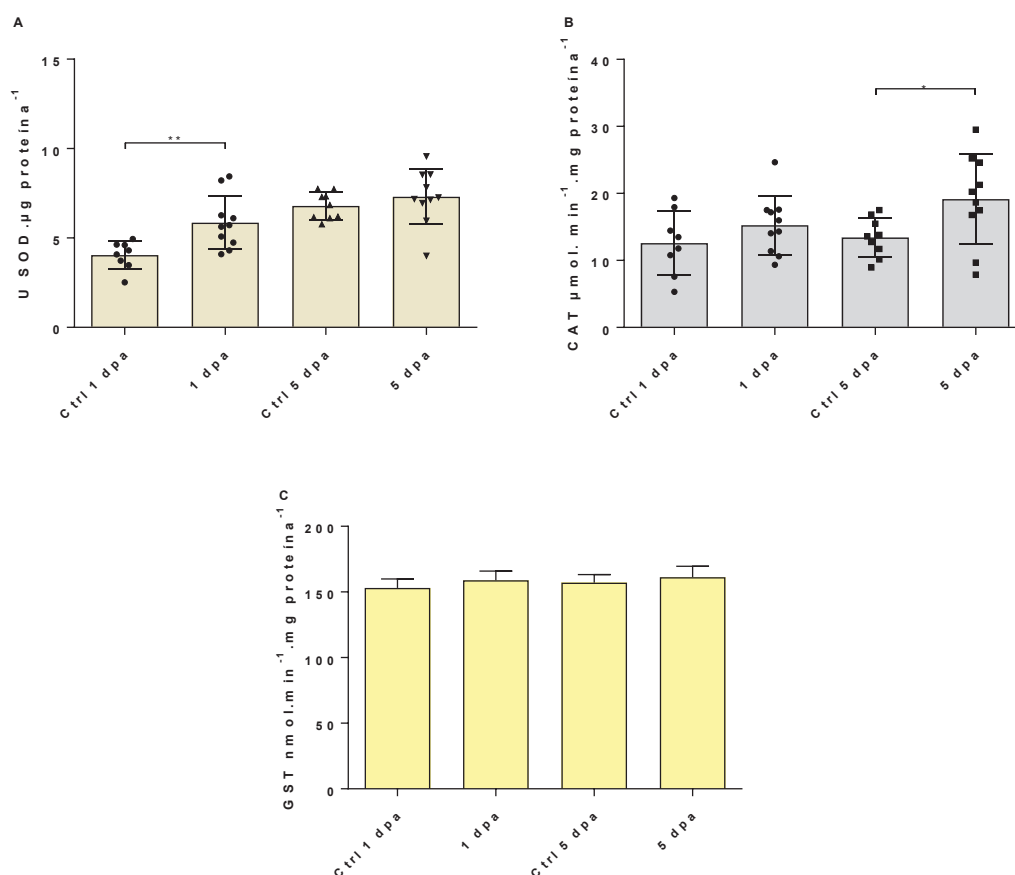
4.4 BALANÇO OXIDATIVO DIFERENCIAL EM DIFERENTES TEMPOS DURANTE A REGENERAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL EM ZEBRAFISH

Previamente foi demonstrado que em 1 dia pós-amputação há uma grande infiltração de macrófagos do tipo M1, ao passo que no dia 5 predominam os macrófagos do tipo M2 na área lesionada, dessa forma, as atividades das enzimas

antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram avaliadas. Vários estudos relatam que seus substratos, peróxido de hidrogênio e íon superóxido, participam da sinalização celular em favor de uma regeneração adequada do tecido (ITO; NAGAYASU; HOSHIKAWA; KATO *et al.*, 2013; LOO; HALLIWELL, 2012; LOO; WONG; HO; WASSER *et al.*, 2012).

Interessantemente, foi demonstrado um aumento da atividade da SOD em 1 dpa quando comparado ao seu controle (FIGURA 10A), demonstrando que o superóxido foi formado após a ocorrência da lesão. Nesse tempo, 24 horas após a amputação (hpa), o aumento representou aproximadamente 0,45 vezes maior atividade de superóxido quando comparado aos animais não submetidos à amputação. Corroborando esses dados, não foi observada diferença na atividade da SOD nos animais em 5 dpa, quando comparados ao seu controle (Fig. 10A). Aos 5 dpa, no entanto, foi apresentado um aumento na CAT em comparação com o grupo controle, sugerindo que o peróxido de hidrogênio está sendo gerado (FIGURA 10B). A atividade de CAT encontrada neste período teve um aumento médio de 42,54%, o que indica que durante essa fase de regeneração ainda há uma síntese aumentada de peróxido de hidrogênio. Paralelamente, avaliou-se a atividade da glutathione-S-transferase (GST) nos dois tempos da regeneração e em seus controles (larvas com 4 e 8 dpf), uma vez que essa enzima está envolvida no processo de biotransformação de fase II, tornando-se um controle para os experimentos de análise da atividade das demais enzimas antioxidantes (TIERBACH; GROH; SCHÖNENBERGER; SCHIRMER *et al.*, 2018). Não foram demonstradas diferenças estatísticas significativas para GST entre os dois grupos avaliados, o que indica que não houveram reações de conjugação de fármacos durante o processo regenerativo (FIGURA 10C).

FIGURA 10 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SUPERÓXIDO DISMUTASE, CATALASE E GLUTATIONA-S-TRANSFERASE NOS DIAS 1 E 5 PÓS-AMPUTAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL



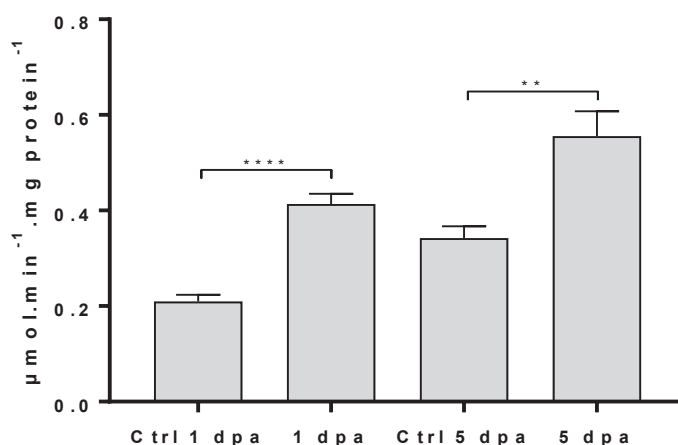
FONTE: A autora (2020).

Legenda: (A) Atividade da SOD expressa em U. SOD (μg) normalizada pela quantidade total de proteína em 1 e 5 dpa; e seus respectivos controles (Ctrl 1 dpa and Ctrl 5 dpa). ** indica diferença estatística entre 1 dpa e seu controle ($n=8-10$). $P<0.01$. (B) Atividade da CAT expressa em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína $^{-1}$ em 1 e 5 dpa e seus respectivos controles. * indica diferenças estatísticas entre 5 dpa e seu grupo controle. (C) Atividade da enzima GST expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína $^{-1}$ em 1, 5 dpa e seus respectivos controles, indicando que não há alterações de atividade durante a regeneração caudal ($n=8-10$). $P<0.05$.

Além disso, para avaliar a lipoperoxidação, realizou-se um ensaio baseado no método químico de FOX, que consiste em medir a absorbância após oxidação rápida de Fe^{2+} a Fe^{3+} mediada por peróxido (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992). Esse método foi empregado para avaliar o estresse oxidativo e percebeu-se que a lesão na nadadeira caudal era capaz de gerar estresse, que não é superado, conforme constatado, até o quinto dia. Apesar do estresse oxidativo encontrado, esse demonstra estar diminuindo gradualmente, uma vez que se comparadas em 1 dpa, as larvas em regeneração

apresentaram 96,99% mais peroxidação do que seus controles (GRÁFICO 5), ao passo que em 5 dpa as larvas apresentaram um aumento de 62,39% na peroxidação lipídica comparada ao controle, o que denota então, uma redução gradativa nos níveis de lipoperóxido ao longo do tempo.

GRÁFICO 5 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LARVAS DE ZEBRAFISH DURANTE O PROCESSO REGENERATIVO



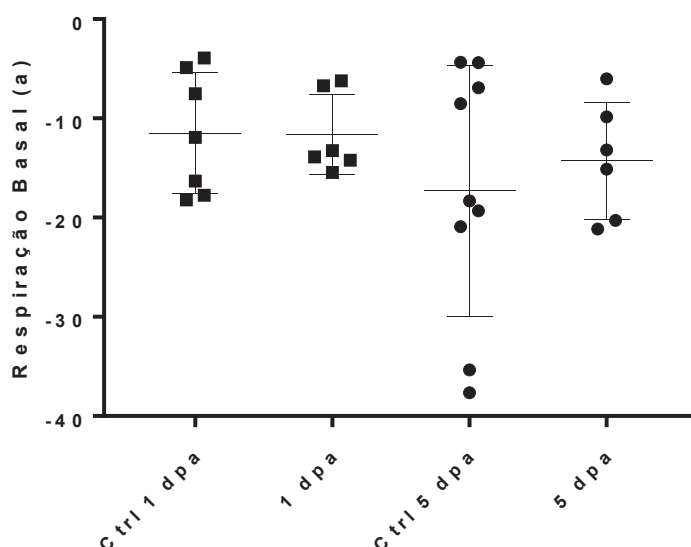
FONTE: A autora (2020).

Legenda: Lipoperoxidação expressa em $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg} \text{ proteína}^{-1}$ em 1 e 5 dpa e seus respectivos controles (n=8-10). **($P < 0.0026$) indica diferenças estatísticas entre 5 dpa e seu grupo controle e ****($P < 0.0001$) diferenças entre 1 dpa e Ctrl 1 dpa.

4.5 TAXAS DE RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM DOIS TEMPOS DO PROCESSO REGENERATIVO DA NADADEIRA CAUDAL DO ZEBRAFISH

Com o intuito de se avaliar a respiração em larvas de zebrafish durante o processo de regeneração da nadadeira caudal, realizaram-se experimentos no respirômetro Oroboros O2k. As larvas foram colocadas em câmaras que permitem o monitoramento em tempo real das concentrações e consumo de oxigênio dentro da câmara. Com base nesses resultados, é possível calcular seus respectivos coeficientes angulares (a), para que se avalie o consumo de oxigênio ao longo do tempo pelas amostras. Para esse primeiro ensaio, não foram encontradas diferenças significativas na respiração basal entre as larvas controle e as larvas nos dias 1 e 5 pós-amputação (GRÁFICO 6).

GRÁFICO 6 – REPRESENTAÇÃO DA RESPIRAÇÃO BASAL DE LARVAS CONTROLE FRENTE À LARVAS EM REGENERAÇÃO



Legenda: o gráfico representa a respiração basal das larvas em 1 e 5 dpa e de seus respectivos controles (Ctrl 1 dpa e Ctrl 5 dpa), demonstrados pelo coeficiente angular das retas geradas nas análises por respirometria (n= 6-9).

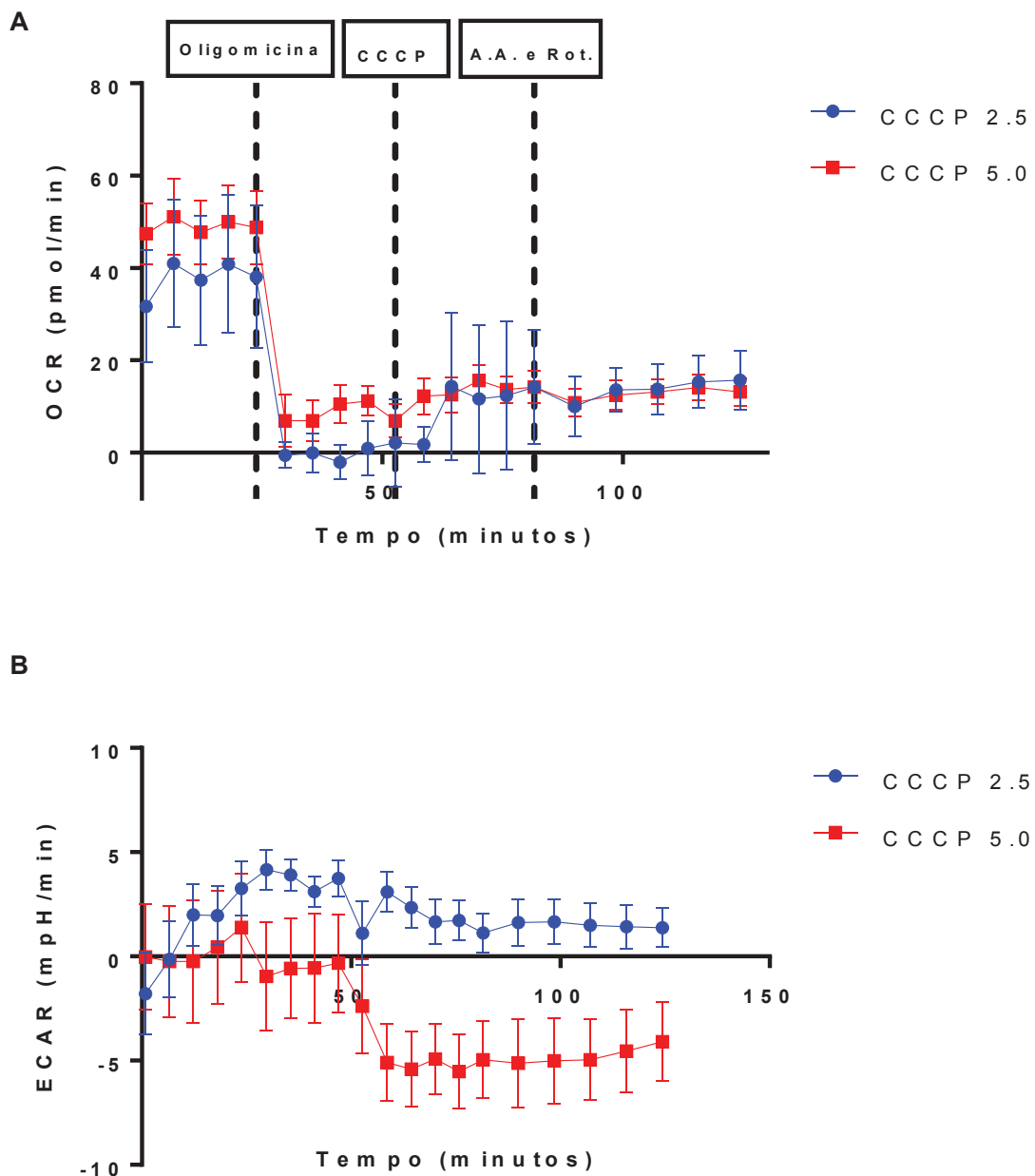
Em uma tentativa de padronização dos ensaios por respirometria de alta resolução, foram isoladas larvas com 8 dias pós-fertilização para o experimento que permite a avaliação da respiração mitocondrial ao serem empregadas drogas inibidoras de complexos da cadeia de fosforilação oxidativa (oligomicina, CCCP, antimicina A e rotenona). Na primeira tentativa utilizou-se 1 μ M de oligomicina e duas concentrações finais distintas de CCCP (2.5 e 5.0 μ M).

A análise metabólica que utiliza o equipamento Seahorse XF24 para medição da respiração mitocondrial, em tempo real, pode produzir dados valiosos acerca do metabolismo celular em diferentes condições ambientais. A técnica baseia-se na adição de drogas que manipulam a respiração mitocondrial, influenciando na concentração de oxigênio e na acidificação do meio no qual estão as amostras, e esses parâmetros, por sua vez, tem suas alterações detectadas por sensores de oxigênio e H^+ , permitindo que o metabolismo celular seja avaliado em diversos contextos. A respiração mitocondrial é determinada pela medição da OCR (taxa de consumo de oxigênio), ao serem adicionados compostos no meio. Através desse ensaio podem-se identificar parâmetros metabólicos como respiração basal, síntese de ATP, vazamento de prótons, respiração máxima, respiração não-mitocondrial e

capacidade respiratória livre. Resumidamente, o ensaio utiliza quatro inibidores: oligomicina, CCCP, rotenona e antimicina A. Na cadeia respiratória, a oligomicina inibe a função da ATP-sintase, a CCCP é um desacoplador mitocondrial, a rotenona inibe o complexo I e a antimicina A inibe o complexo III. O teste compreende a repetição de 20 ciclos de 2 minutos para homogeneização, 1 minuto de espera e 2 minutos de medição. Nos primeiros 5 ciclos, é medida a respiração basal, e em seguida é injetada a oligomicina e medida em outros 5 ciclos. A OCR da oligomicina é utilizada para determinar o *turnover* de ATP através da distinção do consumo de oxigênio dedicado à síntese de ATP e o consumo de oxigênio que ocorre devido ao vazamento de prótons através da membrana interna mitocondrial. Então o CCCP é adicionado em cada poço e medido em outros 5 ciclos, o que permite a identificação da respiração máxima. Calcula-se a capacidade respiratória livre (capacidade do sistema de aumentar a produção de ATP) ao se subtrair a respiração basal da respiração máxima. Por fim, é adicionada a combinação de rotenona/antimicina A, e medida por 5 repetições. Essa injeção inibe completamente a cadeia de transporte de elétrons, permitindo a determinação do consumo de oxigênio não-mitocondrial. Essa é determinada subtraindo-se a respiração pós-adição de rotenona/antimicina A da respiração sob efeito da oligomicina. Por fim, a capacidade respiratória mitocondrial máxima pode ser calculada excluindo a respiração mediada pela rotenona/antimicina A da respiração mediada pela CCCP (BOND; MCEWEN; YOGANANTHARAJAH; GIBERT, 2018).

Observou-se que houve um decréscimo na taxa de consumo de oxigênio após a injeção da oligomicina, conforme se esperava, porém ao se adicionar CCCP, em qualquer uma das concentrações, não houve a recuperação da respiração máxima nas larvas (FIGURA 11A).

FIGURA 11 – GRÁFICOS DE TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OCR) E TAXA DE ACIDIFICAÇÃO EXTRACELULAR (ECAR) EM LARVAS DE ZEBRAFISH COM 8 DPF



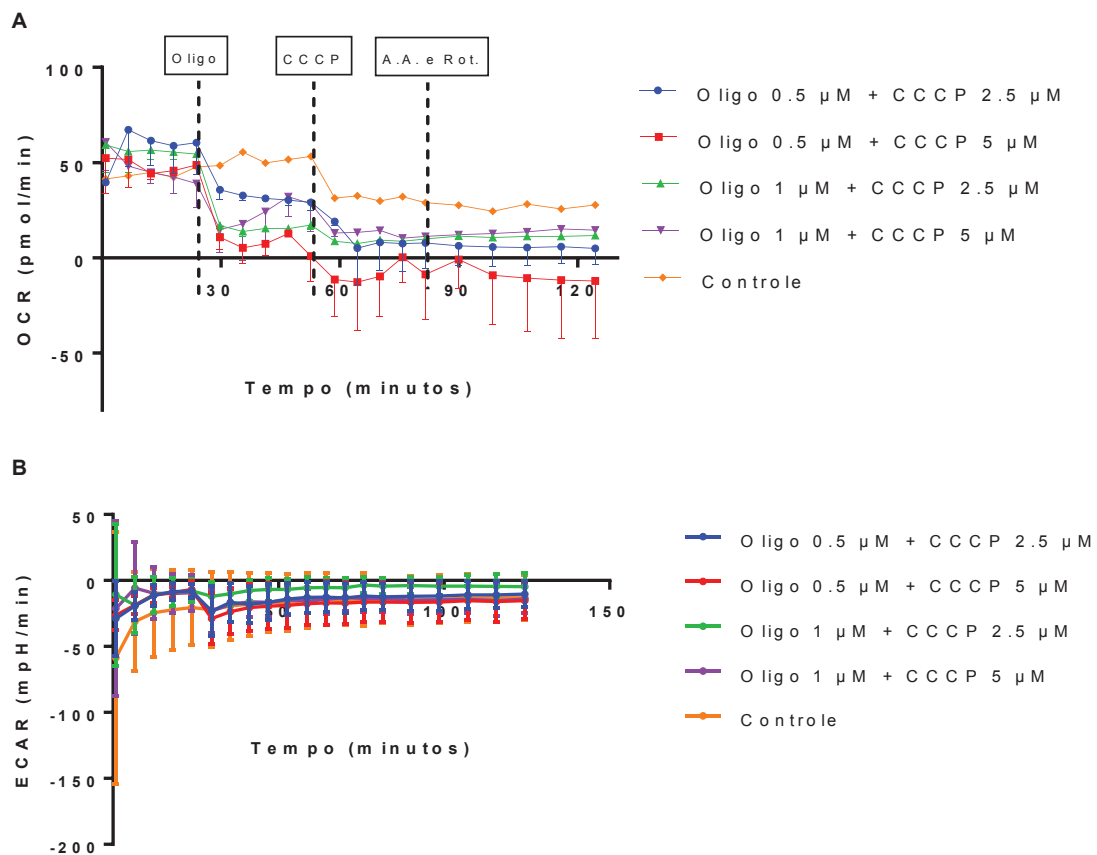
FONTE: A autora (2020).

Legenda: (A) Gráfico demonstra a respiração de larvas de zebrafish com 8 dias pós-fertilização após a adição de oligomicina, CCCP em concentrações de 2.5 e 5.0 μM e antimicina A e rotenona, indicando resposta à injeção de oligomicina e o não atingimento de respiração máxima ao utilizar CCCP nas duas diferentes concentrações. (B) O gráfico indica a taxa de acidificação extracelular (pH do meio), representando grandes variações entre as amostras. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

Em outra tentativa, foram injetadas duas diferentes concentrações finais de oligomicina, de 1 μM e 0.5 μM e combinadas com as concentrações finais de CCCP iguais as do ensaio anterior. Adicionalmente, alguns poços foram destinados as larvas

controle, sem adição de drogas ao longo do experimento. Indica-se a partir do grupo controle, que há um decréscimo da respiração basal durante os 120 minutos do ensaio (FIGURA 12A), o que demonstra que as condições ainda não são ideais para a mensuração da respiração mitocondrial das larvas, sendo necessárias outras adaptações.

FIGURA 12 – GRÁFICOS DE TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OCR) E TAXA DE ACIDIFICAÇÃO EXTRACELULAR (ECAR) EM LARVAS DE ZEBRAFISH COM 8 DPF



FONTE: A autora (2020).

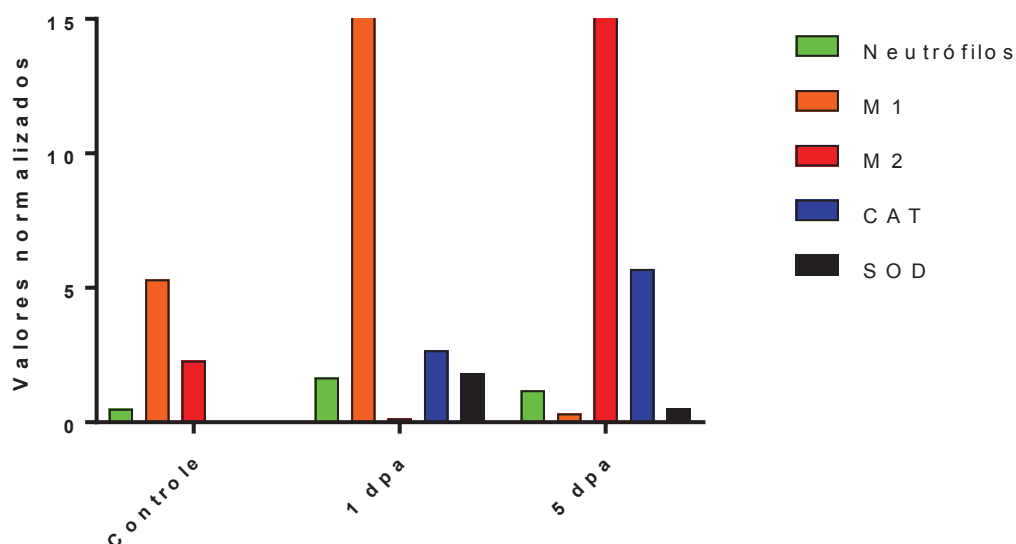
Legenda: (A) O gráfico indica variações na taxa de consumo de oxigênio de todos os grupos, incluindo o grupo controle, que tem sua respiração basal diminuída ao longo do ensaio. (B) O gráfico demonstra a taxa de acidificação extracelular, não representando grandes variações entre as amostras. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

4.6 INFILTRAÇÃO CELULAR APÓS AMPUTAÇÃO E O AMBIENTE REDOX

A partir da normalização dos resultados obtidos para a infiltração de neutrófilos e macrófagos, bem como da alteração na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, torna-se possível correlacionar o aumento ou diminuição da

infiltração dessas células com o perfil redox das larvas durante a regeneração da nadadeira caudal. Com um aumento expressivo de macrófagos pró-inflamatórios na lesão em 1 dia pós-amputação, também há aumento na atividade da enzima superóxido dismutase, responsável pela geração de peróxido de hidrogênio, molécula que, por sua vez, acarreta no recrutamento de mais células em direção à lesão. Além disso, o ambiente pró-inflamatório leva ao aumento da síntese de espécies reativas de oxigênio, tornando-se necessário o aumento da expressão de enzimas antioxidantes, como é o caso da SOD, para minimizar os efeitos do estresse oxidativo. O aumento no número de neutrófilos nessa fase (0 para 24 horas pós-amputação) também é evidente, seguido de sua resolução nos próximos dias, de forma concomitante com o surgimento de macrófagos anti-inflamatórios e diminuição da atividade da superóxido dismutase. Em 5 dias pós-amputação, é observado um aumento significativo na atividade da catalase, outra enzima com papel antioxidante, que tem como substrato o peróxido de hidrogênio. A catalase é responsável pela geração de um ambiente menos inflamatório, juntamente com as células M2, que tem um metabolismo relacionado com a síntese de ácidos graxos e fosforilação oxidativa. As células M2 são atribuídas como relevantes para a deposição de matrizes extracelulares, promoção de angiogênese, etc. A dinâmica de infiltração das células do sistema imune inato e o perfil redox das larvas durante a regeneração da nadadeira caudal podem ser melhor visualizadas no GRÁFICO 7.

GRÁFICO 7 – CORRELAÇÃO ENTRE A DINÂMICA DE INFILTRAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INATO E AS ENZIMAS CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE DURANTE A REGENERAÇÃO DA NADADEIRA CAUDAL DO ZEBRAFISH



Legenda: Os valores de infiltração de neutrófilos e macrófagos, bem como de atividade de catalase e superóxido dismutase foram normalizados e adaptados para inserção em um gráfico no qual se correlacionam a infiltração de cada tipo celular e o aumento ou diminuição da atividade das enzimas do sistema antioxidante ao longo da regeneração, nos tempos de 1 e 5 dias pós-amputação. Os valores reais de M1 e M2 em 1 e 5 dpa, respectivamente, foram recortados do gráfico para fins visuais, e são de 33,7 para M1 e 21,75 para M2.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstrou-se que o processo regenerativo da nadadeira caudal em larvas de zebrafish possui uma duração de sete dias, ao levar-se em consideração a área da nadadeira caudal dos animais submetidos à amputação frente à área dos animais não-amputados. Em outro estudo, a regeneração é considerada completa em 3 dias, tendo como parâmetros de observação as mudanças de formato das células mesenquimais e uma malha complexa de actina, ambas características presentes em larvas em regeneração e que não são encontradas em 3 dias pós-amputação (MATEUS; PEREIRA; SOUSA; DE LIMA *et al.*, 2012). Sugere-se essa diferença entre os tempos para término da fase de regeneração por conta de parâmetros distintos avaliados, e torna-se importante ressaltar que existem poucos estudos que abordam essa fase da regeneração em zebrafish. Apesar disso, é interessante enfatizar que a maior taxa de crescimento da nadadeira caudal no modelo apresentado nesse estudo ocorreu no período entre 2 e 3 dpa, mesmo período em que o estudo anteriormente citado descreve mudanças na polarização das células mesenquimais.

A infiltração de neutrófilos acontece de maneira bem precoce, sendo essas células encontradas na margem da lesão em 1 hora pós-amputação, com um aumento no infiltrado bem evidenciado entre 7 e 24 hpa. Em 168 hpa, há uma grande diminuição nesse infiltrado, demonstrando uma resolução da inflamação dirigida por neutrófilos, que pode ser explicada pelo maior acúmulo de macrófagos anti-inflamatórios ou pró-resolutivos na região da lesão a partir do quinto dia pós-amputação. Os macrófagos de perfil pró-inflamatório surgem desde o início da lesão tendo um aumento gradativo entre os dias 0 e 2, com o maior infiltrado registrado em 2 dpa. Esse resultado condiz com estudos disponíveis na literatura científica, a exemplo de um estudo que observou o recrutamento, dentro das primeiras horas pós-lesão, de macrófagos tanto provenientes do tecido hematopoiético caudal, quanto de macrófagos periféricos (MORALES; ALLENDE, 2019). Outros estudos reportam, de maneira similar, o rápido recrutamento de macrófagos e neutrófilos após a amputação da nadadeira caudal (ELLETT; PASE; HAYMAN; ANDRIANOPOULOS *et al.*, 2011; GRAY; LOYNES; WHYTE; CROSSMAN *et al.*, 2011). Os neutrófilos infiltram primeiro, devido à sua maior motilidade e, dentro de alguns minutos apresentam características apoptóticas, como a condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Essas

células são, então, removidas pelos macrófagos recém-recrutados. Os macrófagos, por sua vez, por apresentarem características de fagocitose profissional, são responsáveis pela remoção de debris celulares e de neutrófilos a partir de 6 hpa, levando à diminuição gradual no número de neutrófilos (LI; YAN; SHI; ZHANG *et al.*, 2012), correspondendo com a redução encontrada no infiltrado de 7 para 24 hpa no presente estudo em animais *lyz⁺/mpx⁺*. Adicionalmente, na fase de regeneração, entre os dias 4 e 5 pós-amputação, os macrófagos ainda são encontrados na borda da lesão no estudo anteriormente citado, o que sugeriu a participação dessas células no remodelamento e crescimento da nadadeira caudal em larvas de zebrafish, conforme depois demonstrado utilizando-se zebrafish mutantes para o gene *irf8*, que leva à depleção de macrófagos.

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes e terminalmente diferenciados com diversos aparatos para eliminação de patógenos (MANTOVANI; CASSATELLA; COSTANTINI; JAILLON, 2011). Tradicionalmente essas células eram consideradas transcrionalmente inativas, mas estudos recentes na área têm levado a uma troca de paradigmas na biologia de neutrófilos, revelando subpopulações heterogêneas, com funções relevantes para a inflamação e imunidade (KUMAR; DIKSHIT, 2019). Dentre as funções apresentadas estão a fagocitose, o *burst* oxidativo e as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (BRINKMANN; REICHARD; GOOSMANN; FAULER *et al.*, 2004; NATHAN, 2006; SEGAL, 2005). É importante ressaltar que o metabolismo celular tem um papel decisivo na função e plasticidade de diversas células imunes, incluindo de células T e macrófagos (GABER; STREHL; BUTTGEREIT, 2017; O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). Regulações metabólicas presentes em neutrófilos vêm sendo estudadas, tendo sido reconhecidas em estudos mais recentes rotas metabólicas distintas da glicólise, como o ciclo do ácido cítrico, fosforilação oxidativa, via das pentose-fosfato, oxidação de ácidos graxos, que preenchem as necessidades energéticas, biosintéticas e funcionais dos neutrófilos (AZEVEDO; ROCHAEL; GUIMARÃES-COSTA; DE SOUZA-VIEIRA *et al.*, 2015; JONES; LUO; ARDITA; RICHARDSON *et al.*, 2013; RICHER; SALEI; LASKAY; SEEGER, 2018; RIFFELMACHER; CLARKE; RICHTER; STRANKS *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-ESPINOSA; ROJAS-ESPINOSA; MORENO-ALTAMIRANO; LÓPEZ-VILLEGAS *et al.*, 2015; SIX; LAGRESLE-PEYROU; SUSINI; DE CHAPPEDELAINE *et al.*, 2015). Além disso, essas células utilizam carboidratos, lipídicos, proteínas e aminoácidos para produção de energia e obtém essas moléculas através de diversos

transportadores (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013). Em resposta a estímulos variados, os neutrófilos aumentam a captura de glicose, sugerindo também um papel funcional do metabolismo da glicose na modulação das funções dos neutrófilos (MARATOU; DIMITRIADIS; KOLLIAS; BOUTATI *et al.*, 2007). O conhecimento acerca de receptores de superfície e transportadores que, atuam, em adaptações metabólicas dos neutrófilos continua limitado e são necessários mais estudos na área em relação à metabolômica para um melhor entendimento da dinâmica de infiltração dos neutrófilos e seus papéis desempenhados de acordo com o metabolismo ativado em cada etapa da regeneração, como também em contextos patológicos, como na fibrose.

Como no período entre 0 e 2 dpa foram encontrados maiores números de macrófagos M1 e no dia 5 foi visualizado um maior número de células M2, os tempos de 1 e 5 dpa foram eleitos para as análises de expressão gênica, de atividade enzimática e de respiração mitocondrial. No caso das análises de expressão gênica, não foram demonstradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois tempos de regeneração para os genes inflamatórios *IL1 β* e *TNF α* , bem como para os genes relacionados ao metabolismo de macrófagos, *iNOS* e *ARG1*. Como a lesão provocada na nadadeira caudal das larvas leva à uma inflamação local, sugere-se que esse é o motivo pelo qual não conseguiram-se detectar maiores ou menores níveis das citocinas inflamatórias pela técnica de RT-PCR em 1 dpa e de maiores níveis de *iNOS* e *ARG1* nos tempos de 1 e 5 dpa, respectivamente, que são os tempos que predominariam macrófagos M1 e M2. Estudos de expressão gênica nesse modelo costumam utilizar a técnica de hibridização *in situ* para revelar a expressão espaço-temporal de moléculas de interesse ou a técnica de RT-PCR para células isoladas da nadadeira caudal (HASEGAWA; HALL; CROSIER; ABE *et al.*, 2017; NGUYEN-CHI; LAPLACE-BUILHÉ; TRAVNICKOVA; LUZ-CRAWFORD *et al.*, 2017). Como as larvas foram empregadas em sua totalidade nas análises, isso pode ter influenciado de forma a mascarar os resultados por esses apresentarem uma diferença específica em relação à expressão da larva como um todo.

Após lesões teciduais, as células lesionadas geram peróxido de hidrogênio, que, por sua vez, tem relevância na sinalização redox por ser uma molécula reativa e de fácil difusão, que participa, como já reportado previamente, ativamente na migração de neutrófilos para o local da lesão (NIETHAMMER; GRABHER; LOOK; MITCHISON, 2009). De forma complementar, outro estudo demonstrou, a partir do

mesmo modelo de amputação da nadadeira caudal, que a mieloperoxidase derivada de neutrófilos regula negativamente o *burst* de peróxido de hidrogênio característico da lesão (PASE; NOWELL; LIESCHKE, 2012). Apesar disso, nas análises para as atividades das enzimas antioxidantes foram encontradas diferenças significativas para a superóxido dismutase, enzima que converte o íon superóxido gerado na cadeia de fosforilação oxidativa em peróxido de hidrogênio. A atividade dessa enzima é aumentada em 1 dpa, quando comparada com larvas não-amputadas, o que demonstra um aumento sustentado de peróxido de hidrogênio, que pode ser responsável pela infiltração de neutrófilos que persiste até, pelo menos, 24 horas pós-amputação.

Sabe-se que o metabolismo energético e o estado redox estão intimamente relacionados. Para se obter uma resposta imune adequada, as células devem possuir uma fonte energética rapidamente disponível para migração até o local da inflamação, gerar espécies reativas de oxigênio utilizando NADPH como cofator e engolfar microrganismos ou tecido danificado. Durante o início da inflamação, a polarização de macrófagos para um perfil M1 é dependente de ativação da NOX2, que, através da oxidação da proteína tirosina-fosfatase e ativação da AKT, aumenta o tráfego de transportadores de glicose para a membrana celular, acarretando no aumento da obtenção de glicose para a glicólise (CASBON; LONG; DUNN; ALLEN *et al.*, 2012). A resolução da inflamação é iniciada pelo contato com membranas apoptóticas, que expõe a fosfatidilserina oxidada que interage com o receptor sequestrador (*scavenger*), CD36. Downstream de CD36, a ativação de AMPK e PPAR γ provoca biogênese mitocondrial, expressão de arginase e mudança para a fosforilação oxidativa em macrófagos M2 (OLEFSKY; GLASS, 2010). A síntese de citocinas pró-inflamatórias pelas células M2 diminui, mas a produção de fatores de crescimento que promovem a cicatrização e de citocinas anti-inflamatórias são mantidas para apoiar a restauração da função normal. Além disso, no início da inflamação, a eficiência mitocondrial também é comprometida via nitrosilação da cadeia transportadora de elétrons (GRIFFITHS; GAO; PARARASA, 2017), o que pode sugerir um maior vazamento de elétrons para o oxigênio molecular, levando à uma maior síntese de íon superóxido, o que responderia o aumento na atividade da superóxido dismutase em 1 dia pós-amputação.

O estresse oxidativo é um fenômeno ou condição biológica que ocorre como resultado de um desequilíbrio fisiológico entre os níveis de antioxidantes e oxidantes

em favor dos oxidantes. Dentro das categorias de ação de antioxidantes, as enzimas superóxido dismutase e catalase são consideradas antioxidantes de primeira linha de defesa, por apresentarem ação supressora ou preventiva na formação dos radicais livres ou EROs. A primeira enzima citada catalisa a dismutação do íon superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, e esse último, por sua vez, é decomposto pela catalase em água e oxigênio. Apesar da possibilidade de geração de estresse oxidativo, tem-se relatado que o peróxido de hidrogênio e o íon superóxido podem agir a favor da mitose, promovendo a replicação de DNA e a proliferação celular em uma variedade de cultivos celulares (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; VALKO; LEIBFRTZ; MONCOL; CRONIN *et al.*, 2007).

Diversos fatores podem levar à geração de estresse oxidativo durante a regeneração na nadadeira caudal do zebrafish. O íon superóxido é constantemente produzido através de diferentes processos e fontes, e pode, por variadas vias e reações, formar outras espécies reativas mais reativas (TURRENS, 2003). Esse íon pode produzir diretamente o radical hidroxil ($^{\bullet}\text{OH}$; $^{\bullet}\text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow ^{\bullet}\text{OH}$) ou indiretamente pelo peróxido de hidrogênio na reação de Fenton, que ocorre na presença de Fe^{2+} . Tanto $^{\bullet}\text{O}_2$, quanto $^{\bullet}\text{OH}$ podem atuar nas membranas lipídicas para promover a formação do radical lipídico ($^{\bullet}\text{L}$), que na presença de oxigênio é capaz de gerar o radical peroxil lipídico ($^{\bullet}\text{LOO}$) (LOBO; PATIL; PHATAK; CHANDRA, 2010). Esses radicais atacam membranas lipídicas, iniciando a lipoperoxidação de membranas, uma vez no contexto do estresse oxidativo. Além disso, o peroxinitrato (ONOO^-) pode ser produzido quando o íon superóxido reage com o radical óxido nítrico ($^{\bullet}\text{NO}$), na presença de arginina e da enzima NADPH-oxidase. Esse oxidante também pode causar peroxidação lipídica, além de oxidação proteica e inativação enzimática (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008). Esses mecanismos sugerem explicar a peroxidação lipídica observada após a amputação da nadadeira caudal das larvas de zebrafish, nos tempos de 1 e 5 dpa, com aumento de atividade da SOD em um primeiro momento, indicando uma resposta à produção de íon superóxido, seguida de uma maior atividade da CAT em 5 dpa, que coincide com a fase em que o estresse oxidativo está menos pronunciado, sugerindo uma recuperação do tecido frente aos danos causados pela amputação.

Vale mencionar também que o estresse oxidativo pode ser responsável pela visualização do que seria uma segunda onda de macrófagos M1, observada entre os tempos de 6 e 7 dpa. Relata-se que as células desenvolveram mecanismos para

controlar os níveis de EROs através de vias metabólicas muito bem reguladas, como, por exemplo, utilizar a glicólise ao invés da fosforilação oxidativa, com o intuito de minimizar o estresse oxidativo (USHIO-FUKAI; REHMAN, 2014). Uma alternativa para isso seria a polarização dos macrófagos para um fenótipo pró-inflamatório ou M1, uma vez que essas células possuem como característica metabólica o uso da glicólise como fonte de energia.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio desse estudo é possível concluir que a regeneração no modelo de amputação da nadadeira caudal de larvas de zebrafish é completa em 7 dias, quando avaliado o crescimento da cauda, e que neutrófilos são recrutados imediatamente para a margem da lesão com uma infiltração mais evidente 7 horas após a transecção, apresentando a resolução da inflamação promovida por essas células em 168 horas. Concomitantemente, macrófagos de perfil M1 alcançam a borda da lesão em 0 dias pós-amputação, com um aumento mais pronunciado no infiltrado em 48 horas, período no qual a enzima superóxido dismutase apresenta maior atividade, levando à geração de peróxido de hidrogênio, molécula que participa indiretamente no recrutamento de mais células do sistema imune em direção à lesão. Então, macrófagos de fenótipo anti-inflamatório ou pró-resolutivo são encontrados na região regenerativa em 5 dias após a amputação, momento no qual a enzima antioxidante catalase também possui atividade aumentada. Por fim, são demonstrados indícios de estresse oxidativo durante o processo regenerativo, pelo aumento da peroxidação de membranas lipídicas em animais submetidos à amputação, estresse que demonstra uma tendência de diminuição ao longo da regeneração.

O modelo de amputação da nadadeira caudal em larvas de zebrafish desenvolvido no presente estudo poderá servir como base a outros estudos de inflamação e fibrose, além de ser empregado em outros contextos patológicos. Em relação ao imunometabolismo, ainda existem questões a serem elucidadas, como, por exemplo, a identificação das vias metabólicas fundamentais ao longo do processo regenerativo, questão que pode ser respondida ao utilizar-se do modelo de amputação em animais adultos. Para finalizar, também são necessárias adaptações em relação à detecção de espécies reativas de oxigênio e da visualização de mitocôndrias *in vivo*, sendo esse último inovador ao criar-se um zebrafish *reporter* para algum gene específico da cadeia de fosforilação oxidativa.

REFERÊNCIAS

- ABNAVE, P.; GHIGO, E. Role of the immune system in regeneration and its dynamic interplay with adult stem cells. **Semin Cell Dev Biol**, 87, p. 160-168, 03 2019.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984.
- AKIMENKO, M. A.; JOHNSON, S. L.; WESTERFIELD, M.; EKKER, M. Differential induction of four msx homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. **Development**, 121, n. 2, p. 347-357, Feb 1995.
- ANTINUCCI, P.; HINDGES, R. A crystal-clear zebrafish for in vivo imaging. **Sci Rep**, 6, p. 29490, 07 2016.
- AZEVEDO, E. P.; ROCHAEL, N. C.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; DE SOUZA-VIEIRA, T. S. *et al.* A Metabolic Shift toward Pentose Phosphate Pathway Is Necessary for Amyloid Fibril- and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. **J Biol Chem**, 290, n. 36, p. 22174-22183, Sep 2015.
- BAE, Y. S.; OH, H.; RHEE, S. G.; YOO, Y. D. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. **Mol Cells**, 32, n. 6, p. 491-509, Dec 2011.
- BEFFAGNA, G. Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury: How Fish Could Help Humans. **Front Cardiovasc Med**, 6, p. 107, 2019.
- BLUM, N.; BEGEMANN, G. Retinoic acid signaling controls the formation, proliferation and survival of the blastema during adult zebrafish fin regeneration. **Development**, 139, n. 1, p. 107-116, Jan 2012.
- BOND, S. T.; MCEWEN, K. A.; YOGANANTHARAJAH, P.; GIBERT, Y. Live Metabolic Profile Analysis of Zebrafish Embryos Using a Seahorse XF 24 Extracellular Flux Analyzer. **Methods Mol Biol**, 1797, p. 393-401, 2018.
- BRANCATO, S. K.; ALBINA, J. E. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. **Am J Pathol**, 178, n. 1, p. 19-25, Jan 2011.
- BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, 303, n. 5663, p. 1532-1535, Mar 2004.
- BUCHAN, K. D.; PRAJSNAR, T. K.; OGRYZKO, N. V.; DE JONG, N. W. M. *et al.* A transgenic zebrafish line for in vivo visualisation of neutrophil myeloperoxidase. **PLoS One**, 14, n. 4, p. e0215592, 2019.
- CAO, Q.; HARRIS, D. C.; WANG, Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. **Physiology (Bethesda)**, 30, n. 3, p. 183-194, May 2015.
- CASBON, A. J.; LONG, M. E.; DUNN, K. W.; ALLEN, L. A. *et al.* Effects of IFN- γ on intracellular trafficking and activity of macrophage NADPH oxidase flavocytochrome b558. **J Leukoc Biol**, 92, n. 4, p. 869-882, Oct 2012.

CHABLAIS, F.; JAZWINSKA, A. IGF signaling between blastema and wound epidermis is required for fin regeneration. **Development**, 137, n. 6, p. 871-879, Mar 2010.

CHAZAUD, B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. **Immunobiology**, 219, n. 3, p. 172-178, Mar 2014.

CHEN, Y.; ZENG, S. F.; CAO, Y. F. Oxidative stress response in zebrafish (*Danio rerio*) gill experimentally exposed to subchronic microcystin-LR. **Environ Monit Assess**, 184, n. 11, p. 6775-6787, Nov 2012.

CHENG, B.; CHEN, H. C.; CHOU, I. W.; TANG, T. W. *et al.* Harnessing the early post-injury inflammatory responses for cardiac regeneration. **J Biomed Sci**, 24, n. 1, p. 7, Jan 2017.

D'COSTA, A.; SHEPHERD, I. T. Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. **Zebrafish**, 6, n. 2, p. 169-177, Jun 2009.

DALEY, J. M.; BRANCATO, S. K.; THOMAY, A. A.; REICHNER, J. S. *et al.* The phenotype of murine wound macrophages. **J Leukoc Biol**, 87, n. 1, p. 59-67, Jan 2010.

DAS, A.; SINHA, M.; DATTA, S.; ABAS, M. *et al.* Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. **Am J Pathol**, 185, n. 10, p. 2596-2606, Oct 2015.

DE SANTA, F.; VITIELLO, L.; TORCINARO, A.; FERRARO, E. The Role of Metabolic Remodeling in Macrophage Polarization and Its Effect on Skeletal Muscle Regeneration. **Antioxid Redox Signal**, Oct 2018.

ELLETT, F.; PASE, L.; HAYMAN, J. W.; ANDRIANOPOULOS, A. *et al.* mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. **Blood**, 117, n. 4, p. e49-56, Jan 2011.

ELLIOTT, C. G.; HAMILTON, D. W. Deconstructing fibrosis research: do pro-fibrotic signals point the way for chronic dermal wound regeneration? **J Cell Commun Signal**, 5, n. 4, p. 301-315, Dec 2011.

FORMAN, H. J. Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. **Free Radic Biol Med**, 97, p. 398-407, 08 2016.

FUMAGALLI, M. R.; ZAPPERI, S.; LA PORTA, C. A. M. Regeneration in distantly related species: common strategies and pathways. **NPJ Syst Biol Appl**, 4, p. 5, 2018.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **Int Immunopharmacol**, 17, n. 3, p. 638-650, Nov 2013.

GABER, T.; STREHL, C.; BUTTGEREIT, F. Metabolic regulation of inflammation. **Nat Rev Rheumatol**, 13, n. 5, p. 267-279, May 2017.

GAURON, C.; RAMPON, C.; BOUZAFFOUR, M.; IPENDEY, E. *et al.* Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. **Sci Rep**, 3, p. 2084, 2013.

GEMBERLING, M.; BAILEY, T. J.; HYDE, D. R.; POSS, K. D. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. **Trends Genet**, 29, n. 11, p. 611-620, Nov 2013.

GORDON, S.; MARTINEZ-POMARES, L. Physiological roles of macrophages. **Pflugers Arch**, 469, n. 3-4, p. 365-374, 04 2017.

GRAY, C.; LOYNES, C. A.; WHYTE, M. K.; CROSSMAN, D. C. *et al.* Simultaneous intravital imaging of macrophage and neutrophil behaviour during inflammation using a novel transgenic zebrafish. **Thromb Haemost**, 105, n. 5, p. 811-819, May 2011.

GRIFFITHS, H. R.; GAO, D.; PARARASA, C. Redox regulation in metabolic programming and inflammation. **Redox Biol**, 12, p. 50-57, 08 2017.

HALDAR, M.; MURPHY, K. M. Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. **Immunol Rev**, 262, n. 1, p. 25-35, Nov 2014.

HASCHEMI, A.; KOSMA, P.; GILLE, L.; EVANS, C. R. *et al.* The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. **Cell Metab**, 15, n. 6, p. 813-826, Jun 2012.

HASEGAWA, T.; HALL, C. J.; CROSIER, P. S.; ABE, G. *et al.* Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. **Elife**, 6, 02 2017.

HIROSE, K.; SHIOMI, T.; HOZUMI, S.; KIKUCHI, Y. Mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling regulates cell proliferation, cell survival, and differentiation in regenerating zebrafish fins. **BMC Dev Biol**, 14, p. 42, Dec 2014.

HORCKMANS, M.; RING, L.; DUCHENE, J.; SANTOVITO, D. *et al.* Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. **Eur Heart J**, 38, n. 3, p. 187-197, 01 2017.

ITO, J.; NAGAYASU, Y.; HOSHIKAWA, M.; KATO, K. H. *et al.* Enhancement of FGF-1 release along with cytosolic proteins from rat astrocytes by hydrogen peroxide. **Brain Res**, 1522, p. 12-21, Jul 2013.

ITO, K.; MORIOKA, M.; KIMURA, S.; TASAKI, M. *et al.* Differential reparative phenotypes between zebrafish and medaka after cardiac injury. **Dev Dyn**, 243, n. 9, p. 1106-1115, Sep 2014.

ITOU, J.; KAWAKAMI, H.; BURGOYNE, T.; KAWAKAMI, Y. Life-long preservation of the regenerative capacity in the fin and heart in zebrafish. **Biol Open**, 1, n. 8, p. 739-746, Aug 2012.

JANTSCH, J.; BINGER, K. J.; MÜLLER, D. N.; TITZE, J. Macrophages in homeostatic immune function. **Front Physiol**, 5, p. 146, 2014.

JAŻWIŃSKA, A.; BADA KOV, R.; KEATING, M. T. Activin-betaA signaling is required for zebrafish fin regeneration. **Curr Biol**, 17, n. 16, p. 1390-1395, Aug 2007.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal Biochem**, 202, n. 2, p. 384-389, May 1992.

JIN, H.; LI, L.; XU, J.; ZHEN, F. *et al.* Runx1 regulates embryonic myeloid fate choice in zebrafish through a negative feedback loop inhibiting Pu.1 expression. **Blood**, 119, n. 22, p. 5239-5249, May 2012.

JOHNSON, S. L.; WESTON, J. A. Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in Zebrafish fin regeneration. **Genetics**, 141, n. 4, p. 1583-1595, Dec 1995.

JONES, R. M.; LUO, L.; ARDITA, C. S.; RICHARDSON, A. N. *et al.* Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. **EMBO J**, 32, n. 23, p. 3017-3028, Nov 2013.

JOUNAI, N.; KOBIYAMA, K.; TAKESHITA, F.; ISHII, K. J. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. **Front Cell Infect Microbiol**, 2, p. 168, 2012.

JULIER, Z.; PARK, A. J.; BRIQUEZ, P. S.; MARTINO, M. M. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. **Acta Biomater**, 53, p. 13-28, 04 2017.

KAN, N. G.; JUNG HANS, D.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. **FASEB J**, 23, n. 10, p. 3516-3525, Oct 2009.

KAWAKAMI, A.; FUKAZAWA, T.; TAKEDA, H. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. **Dev Dyn**, 231, n. 4, p. 693-699, Dec 2004.

KEIGHTLEY, M. C.; WANG, C. H.; PAZHAKH, V.; LIESCHKE, G. J. Delineating the roles of neutrophils and macrophages in zebrafish regeneration models. **Int J Biochem Cell Biol**, 56, p. 92-106, Nov 2014.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B. *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev Dyn**, 203, n. 3, p. 253-310, Jul 1995.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Rev Mol Med**, 13, p. e23, Jul 2011.

KONING, N.; VAN EIJK, M.; POUWELS, W.; BROUWER, M. S. *et al.* Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation. **J Innate Immun**, 2, n. 2, p. 195-200, 2010.

KUMAR, S.; DIKSHIT, M. Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. **Front Immunol**, 10, p. 2099, 2019.

LAI, S. L.; MARÍN-JUEZ, R.; MOURA, P. L.; KUENNE, C. *et al.* Reciprocal analyses in zebrafish and medaka reveal that harnessing the immune response promotes cardiac regeneration. **Elife**, 6, 06 2017.

LAI, S. L.; MARÍN-JUEZ, R.; STAINIER, D. Y. R. Immune responses in cardiac repair and regeneration: a comparative point of view. **Cell Mol Life Sci**, 76, n. 7, p. 1365-1380, Apr 2019.

LAND, W. G. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. **Sultan Qaboos Univ Med J**, 15, n. 2, p. e157-170, May 2015.

LANGSTON, P. K.; SHIBATA, M.; HORNG, T. Metabolism Supports Macrophage Activation. **Front Immunol**, 8, p. 61, 2017.

LECH, M.; ANDERS, H. J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. **Biochim Biophys Acta**, 1832, n. 7, p. 989-997, Jul 2013.

LEOR, J.; PALEVSKI, D.; AMIT, U.; KONFINO, T. Macrophages and regeneration: Lessons from the heart. **Semin Cell Dev Biol**, 58, p. 26-33, 10 2016.

LESSMAN, C. A. The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. **Birth Defects Res C Embryo Today**, 93, n. 3, p. 268-280, Sep 2011.

LI, L.; YAN, B.; SHI, Y. Q.; ZHANG, W. Q. *et al.* Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. **J Biol Chem**, 287, n. 30, p. 25353-25360, Jul 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn Rev**, 4, n. 8, p. 118-126, Jul 2010.

LOO, A. E.; HALLIWELL, B. Effects of hydrogen peroxide in a keratinocyte-fibroblast co-culture model of wound healing. **Biochem Biophys Res Commun**, 423, n. 2, p. 253-258, Jun 2012.

LOO, A. E.; WONG, Y. T.; HO, R.; WASSER, M. *et al.* Effects of hydrogen peroxide on wound healing in mice in relation to oxidative damage. **PLoS One**, 7, n. 11, p. e49215, 2012.

LOVE, N. R.; CHEN, Y.; ISHIBASHI, S.; KRITSILIGKOU, P. *et al.* Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. **Nat Cell Biol**, 15, n. 2, p. 222-228, Feb 2013.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S. K.; GALDIERO, M. R.; SICA, A. *et al.* Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J Pathol**, 229, n. 2, p. 176-185, Jan 2013.

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, 11, n. 8, p. 519-531, Jul 2011.

MARATOU, E.; DIMITRIADIS, G.; KOLLIAS, A.; BOUTATI, E. *et al.* Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. **Eur J Clin Invest**, 37, n. 4, p. 282-290, Apr 2007.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, 47, n. 3, p. 469-474, Sep 1974.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, 6, p. 13, 2014.

MATEUS, R.; PEREIRA, T.; SOUSA, S.; DE LIMA, J. E. *et al.* In vivo cell and tissue dynamics underlying zebrafish fin fold regeneration. **PLoS One**, 7, n. 12, p. e51766, 2012.

MESCHER, A. L. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. **Regeneration (Oxf)**, 4, n. 2, p. 39-53, 04 2017.

MILLET, P.; VACHHARAJANI, V.; MCPHAIL, L.; YOZA, B. *et al.* GAPDH Binding to TNF- α mRNA Contributes to Posttranscriptional Repression in Monocytes: A Novel Mechanism of Communication between Inflammation and Metabolism. **J Immunol**, 196, n. 6, p. 2541-2551, Mar 2016.

MORALES, R. A.; ALLENDE, M. L. Peripheral Macrophages Promote Tissue Regeneration in Zebrafish by Fine-Tuning the Inflammatory Response. **Front Immunol**, 10, p. 253, 2019.

MURRAY, P. J.; ALLEN, J. E.; BISWAS, S. K.; FISHER, E. A. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, 41, n. 1, p. 14-20, Jul 2014.

NAGY, C.; HASCHEMI, A. Time and Demand are Two Critical Dimensions of Immunometabolism: The Process of Macrophage Activation and the Pentose Phosphate Pathway. **Front Immunol**, 6, p. 164, 2015.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, 6, n. 3, p. 173-182, Mar 2006.

NGUYEN-CHI, M.; LAPLACE-BUILHÉ, B.; TRAVNICKOVA, J.; LUZ-CRAWFORD, P. *et al.* TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. **Cell Death Dis**, 8, n. 8, p. e2979, Aug 2017.

NIETHAMMER, P. Wound redox gradients revisited. **Semin Cell Dev Biol**, 80, p. 13-16, 08 2018.

NIETHAMMER, P.; GRABHER, C.; LOOK, A. T.; MITCHISON, T. J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. **Nature**, 459, n. 7249, p. 996-999, Jun 2009.

O'NEILL, L. A.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nat Rev Immunol**, 16, n. 9, p. 553-565, 09 2016.

OISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **Int Immunol**, 30, n. 11, p. 511-528, 10 2018.

OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu Rev Physiol**, 72, p. 219-246, 2010.

PASE, L.; NOWELL, C. J.; LIESCHKE, G. J. In vivo real-time visualization of leukocytes and intracellular hydrogen peroxide levels during a zebrafish acute inflammation assay. **Methods Enzymol**, 506, p. 135-156, 2012.

PEARCE, E. L.; PEARCE, E. J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. **Immunity**, 38, n. 4, p. 633-643, Apr 2013.

PFEFFERLI, C.; JAŻWIŃSKA, A. The art of fin regeneration in zebrafish. **Regeneration (Oxf)**, 2, n. 2, p. 72-83, Apr 2015.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int J Biomed Sci**, 4, n. 2, p. 89-96, Jun 2008.

PINTO, A. R.; GODWIN, J. W.; ROSENTHAL, N. A. Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation. **Stem Cell Res**, 13, n. 3 Pt B, p. 705-714, Nov 2014.

PIROTTE, N.; STEVENS, A. S.; FRAGUAS, S.; PLUSQUIN, M. *et al.* Reactive Oxygen Species in Planarian Regeneration: An Upstream Necessity for Correct Patterning and Brain Formation. **Oxid Med Cell Longev**, 2015, p. 392476, 2015.

POSS, K. D.; SHEN, J.; NECHIPORUK, A.; MCMAHON, G. *et al.* Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. **Dev Biol**, 222, n. 2, p. 347-358, Jun 2000.

POUREETEZADI, S. J.; WINGERT, R. A. Little fish, big catch: zebrafish as a model for kidney disease. **Kidney Int**, 89, n. 6, p. 1204-1210, 06 2016.

RICHER, B. C.; SALEI, N.; LASKAY, T.; SEEGER, K. Changes in Neutrophil Metabolism upon Activation and Aging. **Inflammation**, 41, n. 2, p. 710-721, Mar 2018.

RIFFELMACHER, T.; CLARKE, A.; RICHTER, F. C.; STRANKS, A. *et al.* Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation. **Immunity**, 47, n. 3, p. 466-480.e465, 09 2017.

RODRIGUEZ, A. M.; YIN, V. P. Emerging Roles for Immune Cells and MicroRNAs in Modulating the Response to Cardiac Injury. **J Cardiovasc Dev Dis**, 6, n. 1, Jan 2019.

RODRÍGUEZ-ESPINOSA, O.; ROJAS-ESPINOSA, O.; MORENO-ALTAMIRANO, M. M.; LÓPEZ-VILLEGAS, E. O. *et al.* Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. **Immunology**, 145, n. 2, p. 213-224, Jun 2015.

ROEHL, H. H. Linking wound response and inflammation to regeneration in the zebrafish larval fin. **Int J Dev Biol**, 62, n. 6-7-8, p. 473-477, 2018.

ROMERO, M. M. G.; MCCATHIE, G.; JANKUN, P.; ROEHL, H. H. Damage-induced reactive oxygen species enable zebrafish tail regeneration by repositioning of Hedgehog expressing cells. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 4010, 10 2018.

RÓSZER, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators Inflamm**, 2015, p. 816460, 2015.

SAXENA, S.; SINGH, S. K.; LAKSHMI, M. G.; MEGHAH, V. *et al.* Proteomic analysis of zebrafish caudal fin regeneration. **Mol Cell Proteomics**, 11, n. 6, p. M111.014118, Jun 2012.

SCHÜRMANN, N.; FORRER, P.; CASSE, O.; LI, J. *et al.* Myeloperoxidase targets oxidative host attacks to Salmonella and prevents collateral tissue damage. **Nat Microbiol**, 2, p. 16268, Jan 2017.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol**, 23, p. 197-223, 2005.

SERHAN, C. N.; YANG, R.; MARTINOD, K.; KASUGA, K. *et al.* Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. **J Exp Med**, 206, n. 1, p. 15-23, Jan 2009.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol**, 233, n. 9, p. 6425-6440, 09 2018.

SIX, E.; LAGRESLE-PEYROU, C.; SUSINI, S.; DE CHAPPEDELAINE, C. *et al.* AK2 deficiency compromises the mitochondrial energy metabolism required for differentiation of human neutrophil and lymphoid lineages. **Cell Death Dis**, 6, p. e1856, Aug 2015.

STHIJNS, M. M. J. P.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; LAPOINTE, V. L. S. Redox regulation in regenerative medicine and tissue engineering: The paradox of oxygen. **J Tissue Eng Regen Med**, 12, n. 10, p. 2013-2020, 10 2018.

STOICK-COOPER, C. L.; MOON, R. T.; WEIDINGER, G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. **Genes Dev**, 21, n. 11, p. 1292-1315, Jun 2007.

SZONDY, Z.; SARANG, Z.; KISS, B.; GARABUCZI, É. *et al.* Anti-inflammatory Mechanisms Triggered by Apoptotic Cells during Their Clearance. **Front Immunol**, 8, p. 909, 2017.

TACKE, F.; ZIMMERMANN, H. W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. **J Hepatol**, 60, n. 5, p. 1090-1096, May 2014.

TAN, D. Q.; SUDA, T. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Homeostasis as Regulators of Stem Cell Fate and Function. **Antioxid Redox Signal**, 29, n. 2, p. 149-168, 07 2018.

TANAKA, E. M.; REDDIEN, P. W. The cellular basis for animal regeneration. **Dev Cell**, 21, n. 1, p. 172-185, Jul 2011.

THUMMEL, R.; JU, M.; SARRAS, M. P.; GODWIN, A. R. Both Hoxc13 orthologs are functionally important for zebrafish tail fin regeneration. **Dev Genes Evol**, 217, n. 6, p. 413-420, Jun 2007.

TIERBACH, A.; GROH, K. J.; SCHÖNENBERGER, R.; SCHIRMER, K. *et al.* Glutathione S-Transferase Protein Expression in Different Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicol Sci**, 162, n. 2, p. 702-712, 04 2018.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, 552, n. Pt 2, p. 335-344, Oct 2003.

USHIO-FUKAI, M.; REHMAN, J. Redox and metabolic regulation of stem/progenitor cells and their niche. **Antioxid Redox Signal**, 21, n. 11, p. 1587-1590, Oct 2014.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

- VAN DEN BOSSCHE, J.; BAARDMAN, J.; DE WINTHER, M. P. Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis. **J Vis Exp**, n. 105, Nov 2015.
- VAN DEN BOSSCHE, J.; O'NEILL, L. A.; MENON, D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? **Trends Immunol**, 38, n. 6, p. 395-406, 06 2017.
- VAN GASSEN, N.; STAELS, W.; VAN OVERMEIRE, E.; DE GROEF, S. *et al.* Concise Review: Macrophages: Versatile Gatekeepers During Pancreatic β -Cell Development, Injury, and Regeneration. **Stem Cells Transl Med**, 4, n. 6, p. 555-563, Jun 2015.
- VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: development and tissue specialization. **Annu Rev Immunol**, 33, p. 643-675, 2015.
- VIOLA, A.; MUNARI, F.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, R.; SCOLARO, T. *et al.* The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Front Immunol**, 10, p. 1462, 2019.
- WEHNER, D.; CIZELSKY, W.; VASUDEVARO, M. D.; OZHAN, G. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling defines organizing centers that orchestrate growth and differentiation of the regenerating zebrafish caudal fin. **Cell Rep**, 6, n. 3, p. 467-481, Feb 2014.
- WEHNER, D.; WEIDINGER, G. Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin. **Trends Genet**, 31, n. 6, p. 336-343, Jun 2015.
- WIXON, J. Featured organism: Danio rerio, the zebrafish. **Yeast**, 17, n. 3, p. 225-231, Sep 2000.
- WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, 496, n. 7446, p. 445-455, Apr 2013.
- WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, 44, n. 3, p. 450-462, Mar 2016.
- YANG, W.; TAO, Y.; WU, Y.; ZHAO, X. *et al.* Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 1076, 03 2019.
- YAO, Y.; XU, X. H.; JIN, L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. **Front Immunol**, 10, p. 792, 2019.
- YOO, S. K.; FREISINGER, C. M.; LEBERT, D. C.; HUTTENLOCHER, A. Early redox, Src family kinase, and calcium signaling integrate wound responses and tissue regeneration in zebrafish. **J Cell Biol**, 199, n. 2, p. 225-234, Oct 2012.
- ZHANG, Q.; WANG, Y.; MAN, L.; ZHU, Z. *et al.* Reactive oxygen species generated from skeletal muscles are required for gecko tail regeneration. **Sci Rep**, 6, p. 20752, Feb 2016.

ANEXO I – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO



MINI REVIEW
published: 24 May 2019
doi: 10.3389/fphys.2019.00617



Understanding the Metabolic Profile of Macrophages During the Regenerative Process in Zebrafish

Lais Cavalieri Paredes¹, Niels Olsen Saraiva Camara^{2,3,4} and Tarcio Teodoro Braga^{1*}

¹ Department of Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ² Department of Immunology, Instituto de Biomedical Sciences IV, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ³ Nephrology Division, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴ Renal Pathophysiology Laboratory, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

In contrast to mammals, lower vertebrates, including zebrafish (*Danio rerio*), have the ability to regenerate damaged or lost tissues, such as the caudal fin, which makes them an ideal model for tissue and organ regeneration studies. Since several diseases involve the process of transition between fibrosis and tissue regeneration, it is necessary to attain a better understanding of these processes. It is known that the cells of the immune system, especially macrophages, play essential roles in regeneration by participating in the removal of cellular debris, release of pro- and anti-inflammatory factors, remodeling of components of the extracellular matrix and alteration of oxidative patterns during proliferation and angiogenesis. Immune cells undergo phenotypical and functional alterations throughout the healing process due to growth factors and cytokines that are produced in the tissue microenvironment. However, some aspects of the molecular mechanisms through which macrophages orchestrate the formation and regeneration of the blastema remain unclear. In the present review, we outline how macrophages orchestrate the regenerative process in zebrafish and give special attention to the redox balance in the context of tail regeneration.

Keywords: regeneration, macrophage, redox balance, ROS production, zebrafish

OPEN ACCESS

Edited by:
Murugan Velayutham,
University of Pittsburgh, United States

Reviewed by:
Paola Corti,
Vascular Medicine Institute, University
of Pittsburgh, United States
Simona Martinotti,
University of Eastern Piedmont, Italy

***Correspondence:**
Tarcio Teodoro Braga
tarcio.braga@ufpr.br;
tarcio_tbi@yahoo.com.br

Specialty section:
This article was submitted to
Oxidant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 28 January 2019

Accepted: 01 May 2019

Published: 24 May 2019

Citation:
Paredes LC, Olsen Saraiva
Camara N and Braga TT (2019)
Understanding the Metabolic Profile
of Macrophages During
the Regenerative Process
in Zebrafish. *Front. Physiol.* 10:617.
doi: 10.3389/fphys.2019.00617

ZEBRAFISH AND TAIL FIN REGENERATION

Zebrafish is a teleost fish that has been studied and increasingly utilized over the last three decades as an experimental animal model in several areas of science (Renninger et al., 2011; Weyand and Shavit, 2014). The species *D. rerio* belongs to the Animalia kingdom, Chordata phylum, Actinopterygii class (Teleostei infraorder), Cypriniformes order and Cyprinidae family. It is a species of small size that measures approximately 3 cm in adulthood and lives in freshwater rivers and lakes, and it is native to the Himalayan region. Males and females can be anatomically distinguished in a relatively simple way; the males have a thinner body, more prominent black bands throughout the body (which is the origin of the name zebrafish), and a notable golden coloration on the belly and fins. Females, on the other hand, tend to have a more prominent abdominal region, especially during the period of oviposition, and have less gold coloration on the body (Wixson, 2000).